

両親媒性液晶性化合物が示す薬理活性作用
(Biological activity of amphiphilic liquid-crystalline compounds)

弘前大学大学院 理工学研究科

博士後期課程

博士論文

2014年3月

福士 由佳子

目次

序章	1
第一章 液晶性化合物によるヒト巨核球及び血小板産生促進作用	
§ 1. 緒言	18
§ 2. 実験	19
2.1. 液晶性化合物と抗体	19
2.2. CD34 陽性細胞の分離	20
2.3. 液体培養	20
2.4. 免疫学的表面抗原の測定法	21
2.5. Pro-platelet formation 解析	21
2.6. 血小板の機能解析	21
2.7. 統計処理	21
§ 3. 結果と考察	22
3.1. ヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞の増殖に及ぼす液晶性化合物の影響	22
3.2. Pro-platelet formation の解析	26
3.3. 液晶性化合物によって産生促進された血小板の機能解析	27
§ 4. 結言	29
§ 5. 参考文献	30
第二章 棒状液晶性化合物による慢性骨髄性白血病細胞株 K562 へのアポトーシス誘導	
§ 1. 緒言	32
§ 2. 実験	34
2.1. 液晶性化合物	34
2.2. K562 細胞培養方法	35
2.3. 細胞増殖抑制作用方法	35

2.3.1	細胞培養方法	35
2.3.2	細胞計数方法	35
2.4.	細胞周期測定方法	35
2.5.	ウエスタンブロッティング	36
2.6.	Caspase-3 活性化評価方法	37
2.7.	統計処理	37
§ 3.	結果と考察	38
3.1.	K562 細胞増殖抑制作用	38
3.1.1	液晶性化合物による細胞増殖抑制作用	38
3.1.2	細胞増殖抑制作用の濃度依存性	41
3.1.3	細胞増殖抑制作用の時間依存性	42
3.2.	細胞周期測定結果	43
3.3	細胞内情報伝達関連タンパク質の解析	45
3.4.	Caspase 3 活性化によるアポトーシス誘導	47
§ 4.	結言	48
§ 5.	参考文献	49

第三章 末端にヒドロキシル基を有するフェニルベンゾエート誘導体の合成と抗腫瘍効果

§ 1.	緒言	50
§ 2.	実験	51
2.1.	材料	51
2.1.1	精製及び純度測定	51
2.1.2	機器分析	51
2.1.3	フェニルベンゾエート誘導体の合成	52
2.1.3.1	Ethyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)phenyl benzoate (19)の合成	52
2.1.3.2	4-(6-Hydroxyhexyloxy)phenyl benzoic acid (20)の合成	52
2.1.3.3	4-(4-Cyanobiphenyl)phenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (21)の合成	52
2.1.3.4	4-(5-Octylpyrimidine-2-yl)phenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (22)の合成	53
2.1.3.5	4-Cyanophenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (23)の合成	53

2.1.3.6	4-Butylphenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate(24)の合成	54
2.1.3.7	3-Pentyloxyphenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (25)の合成	54
2.1.3.8	4-Butylphenyl 3,4-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (26)の合成	55
2.1.3.9	4-Butylphenyl 3,5-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (27)の合成	55
2.1.3.10	1, 2-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (28)の合成	56
2.1.3.11	1, 3-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (29)の合成	57
2.1.3.12	1, 4-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (30)の合成	57
2.2	物性測定及び薬理活性作用評価方法	58
2.2.1	物性測定	58
2.2.2	細胞株培養方法及び薬理活性作用評価	58
2.2.3	細胞周期測定	59
2.2.4	統計処理	59
§ 3.	結果と考察	61
3.1.	末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体	61
3.1.1	末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体の合成	61
3.1.2	末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体の物性	62
3.1.3	末端ヒドロキシル基を1つ有する フェニルベンゾエート誘導体が A549 細胞の増殖に及ぼす影響	63
3.1.4	集合体形成能	65
3.1.5	抑制作用メカニズム	68
3.1.5.1	細胞増殖抑制作用の濃度依存性	68
3.1.5.2	細胞周期に及ぼす影響	69
3.2.	末端ヒドロキシル基を2つ有するフェニルベンゾエート誘導体	71
3.2.1	末端ヒドロキシル基を2つ有するフェニルベンゾエート誘導体の合成	71
3.2.2	末端ヒドロキシル基を2つ有するフェニルベンゾエート誘導体の物性	74
3.2.3	末端ヒドロキシル基を2つ有する フェニルベンゾエート誘導体が A549 細胞の増殖に及ぼす影響	75
3.2.4	細胞増殖抑制作用の濃度依存性	76
3.2.5	細胞周期に及ぼす影響	77
3.3	固形癌細胞、血球細胞、正常細胞に及ぼす影響	80
§ 4.	結言	82
§ 5.	参考文献	83

総括	84
Publication list.....	86
謝辞	87

序章

1. 液晶とは

液晶の歴史は、1888年にオーストラリアの植物学者 **Friedrich Reinitzer** がコレステリック液晶を発見したことに始まる。彼は、コレステリルベンゾエート(図 1)の結晶が、145.5°Cで不透明な液体となり、178.5°Cで完全に透明な液体になることを見つけた [1]。

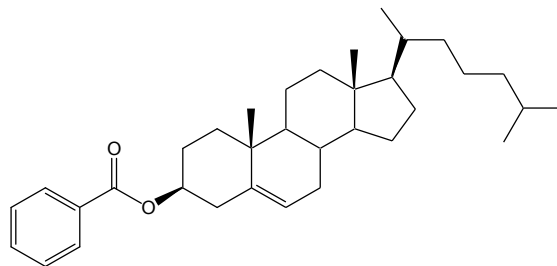


図 1 コレステリルベンゾエートの化学構造

その後、ドイツの物理学者 **Otto Lehman** が、この不透明な液体について調べたところ、液体の流動性と結晶の光学異方性を併せもつことを明らかにした [2]。液晶は、液体と結晶の中間の状態である。分子の配向と、重心の位置に注目して、液体、液晶、結晶の状態を棒状分子によって示す(図 2)。

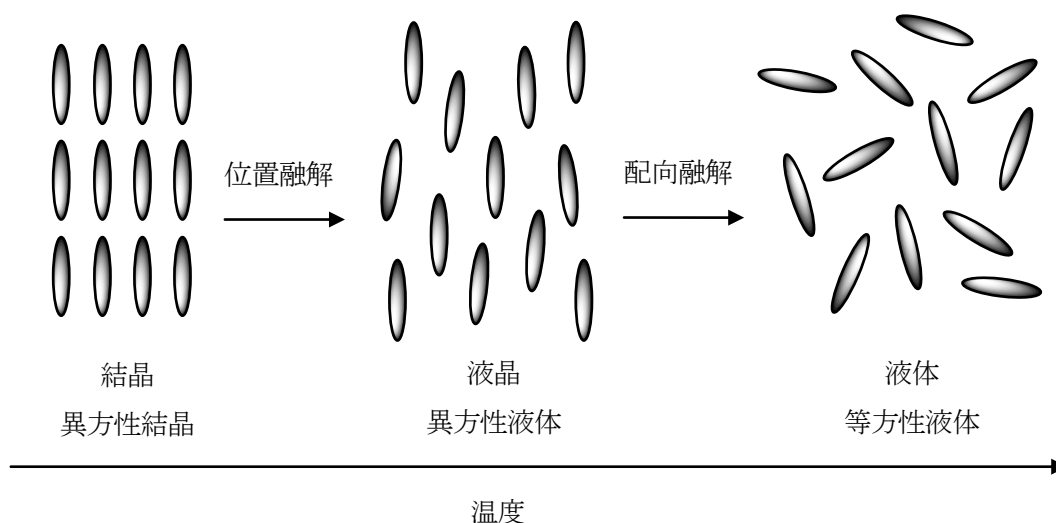


図 2 結晶、液晶、液体状態における分子配向の模式図

結晶では分子の配向と重心の位置は制限される。また、気体や液体は分子の配向および重心位置の秩序が無く、空間的に全ての方向に対して等しい状態である。一方、液晶は重心位置の秩序が完全に、あるいは部分的に失われているが、配向の秩序は残っている。そのため、液晶状態は液体の流動性と結晶の異方性を併せ持った状態である。液晶には、温度によって変化するサーモトロピック液晶と、濃度と温度によって変化するリオトロピック液晶がある。

2. サーモトロピック液晶とその応用

2.1 サーモトロピック液晶における液晶相

サーモトロピック液晶には、3つの基本的な分子配列がある。分子長軸方向にある程度の配向秩序をもち、位置の秩序が完全に失われているネマチック相 (N 相)、分子長軸方向に配向が揃っており、層構造を示すスメクチック相 (Sm 相)、柱状の秩序を持つディスコチック相 (D 相) に大きく分類できる。スメクチック相はさらに、分子が層法線に対して平行に配向している SmA 相と、層法線に対して傾いて配向している SmC 相がある。図 3 に N 相、Sm A 相、Sm C 相、D 相の分子配向モデルを示す。

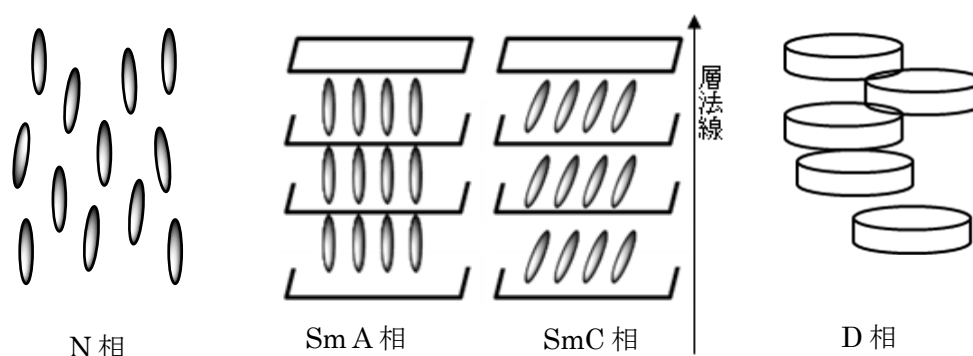


図 3 N 相、SmA 相、Sm C 相、D 相の分子配向モデル

2.2 医療分野におけるサーモトロピック液晶の応用

1968年に Williams と Heilmeyer らが液晶の動的散乱効果を発見したことによって液晶をディスプレイへ応用することが考案され、研究開発が積極的に進められた。1973年に液晶を表示素子に利用した電卓が発売されて以降、携帯電話やノートパソコン、大画面テレビに至るまで、幅広く液晶が使用されており、私達の生活に欠かせないものとなっている。ディスプレイ技術の革新は、低消費電力化、薄型・軽量化、大画面化および高精細化といった多くの要求を可能にしてきた。近年、その特性を生かし、医療現場においても液晶ディスプレイの利用が進んでいる。医療現場では、電子カルテや医用画像診断の表示等に液晶ディスプレイが使用されている。手術室等、多くの医療機器が同時に使用される空間において、ディスプレイ自体が薄く、壁などに自由に配置できることは、作業空間を広げることとなり作業効率を高める。また、生体画像を取り込んだ電子カルテにも応用できる。特に医用画像診断に使われるディスプレイは、細かい病変組織の観察に用いられるために高精細な表示が要求される。これまで乳房 X 線撮影装置 (マンモグラフィ) は 2D 表示であったが、2011年にはナナオ社からマンモグラフィを 3D 表示するための 3D 液晶モニターが発売された。また、パナソニック社は内視鏡手術用の 3D 液晶モニターの開発を進めている。

生体組織をより鮮明に観察するために、液晶チューナブルフィルターが開発されている。図4にその内部構造と外観を示す。チューナブルフィルター内部では、ネマチック液晶が導入された波長板が積層されている。このネマチック液晶の分子配向を電氣的に制御することによって、特定の波長域を0.1 nm という高い分解能で選択的に透過させることができる。透過光波長の制御によって生体組織がより鮮明に観察できるのは、生体中に含まれるコラーゲンやフラビンタンパク質などが、それぞれ異なる励起波長により、そのタンパク質に特徴的な蛍光を発することによる。最も適当な狭帯域の励起波長を選択することによって、目視では難しい組織の形態をより高いコントラストで観察することが可能となる。また、強誘電性液晶を用いた液晶チューナブルフィルターを使い、結膜内の血管に含まれるヘモグロビンレベルの情報をスペクトルとして得ることで、簡便に貧血状態を予測する方法が提案されている[3]。

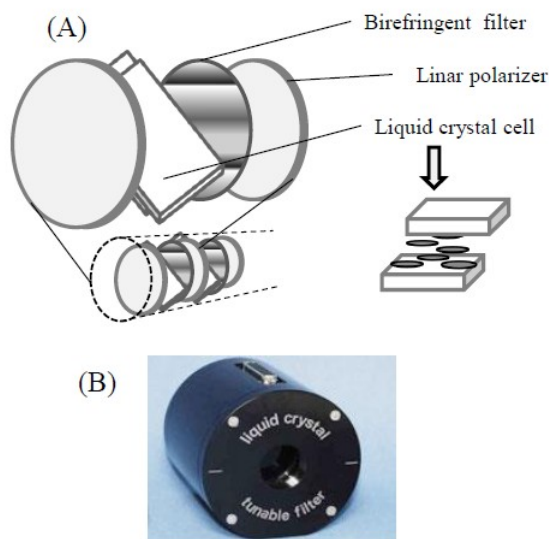


図4 液晶チューナブルフィルター

(A)内部構造の模式図

(B)チューナブルフィルター外観の写真(Meadowlark Optics, Inc.)

3. リオトロピック液晶性その応用及び生体との関連

3.1 リオトロピック液晶が示す集合状態

リオトロピック液晶は、疎水部と親水部を有する両親媒性分子が溶媒の作用により形成する液晶状態である。一分子内に、疎水部と親水部という互いに相容れない部分をもつ両親媒性分子は、溶媒中で不均一化し、マイクロ相分離することによってリオトロピック液晶を発現する。その集合状態は、濃度や温度に依存して変化する。濃度の増加に伴い発現するリオトロピック液晶相は、ラメラ相、双連続キュービック相、ヘキサゴナルカラムナー相、ミセルキュービック相に変化する。これらの集合状態を図5にまとめた。

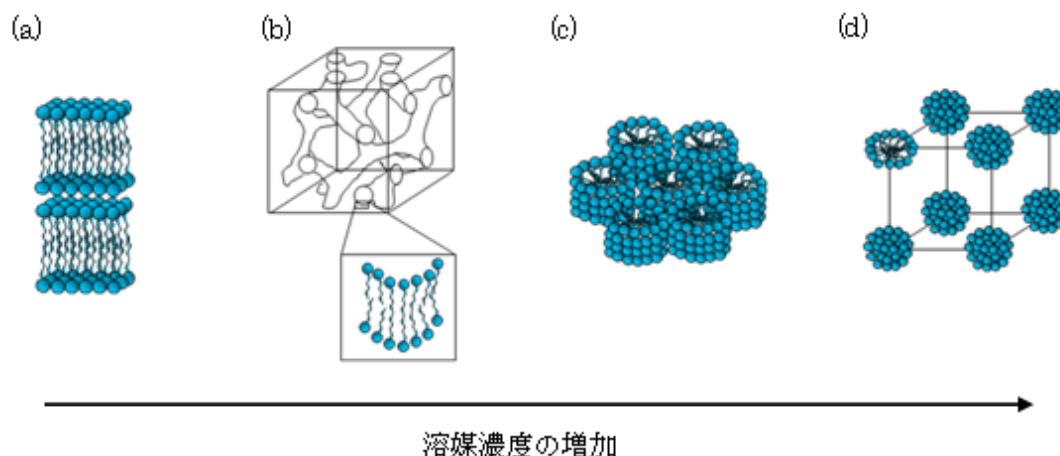


図5 溶媒の濃度増加に伴う集合状態

(a)ラメラ相、(b)双連続キュービック相、
(c)ヘキサゴナルカラムナー相、(d)ミセルキュービック相

図5の(a)ラメラ相は、二分子膜が層状に重なった構造を有するが、これは、生体膜の構造に類似している[4]。(b)双連続キュービック相は、連続した2つの層が3次的に絡み合ってきた立方相で、光学的に等方で複屈折を示さないという特徴がある[5]。(c)ヘキサゴナルカラムナー相は、カラム構造が二次元六方格子を形成するように集合した相であり[6]、(d)ミセルキュービック相は、格子状にミセルが充填されている相である[7]。生体系の組織の多くはリオトロピック液晶構造を持っている。例えば、脳、神経細胞といった組織はラメラ相と同様に二分子膜が層状に積み重なった構造である[8]。

3.2 細胞膜

生体膜は、両親媒性分子であるリン脂質を主成分とし、ラメラ構造を形成している。生体膜の一つである細胞膜に注目して、その構造と機能を簡単に述べる。細胞膜のモデルに、1972年に Singer と Nicolson によって提唱された流動モザイクモデルがある[9]。流動モザイクモデルとは、細胞膜中に存在するタンパク質が、流動的な脂質二分子膜中に、モザイク状に分布しているモデルである。膜の中をタンパク質は自由に拡散できる(図 6)。また、脂質二分子膜の厚さは約 5 nm である。

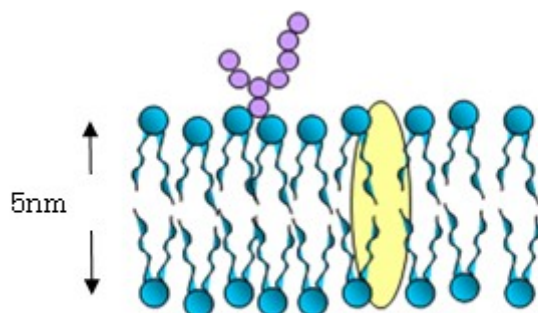


図 6 細胞膜の流動モザイクモデル

細胞膜は流動性をもっており、細胞膜を構成するリン脂質分子は、細胞膜の外層から内層へと、もしくは、内層から外層へと 180 度向きを変えることができる。前者の運動をフリップ運動といい、後者の運動をフロップ運動という。このような脂質分子の移動は各々の運動を合わせて、フリップ-フロップと呼ばれている(図 7) [10]。リン脂質の分布は細胞内外において非対称に分布していると考えられているが、フリップ-フロップは、リン脂質の非対称分布を保持するために必要不可欠な運動である。

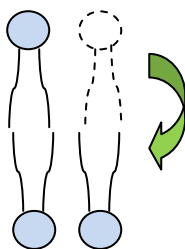


図 7 脂質分子のフリップ - フロップ運動

細胞膜の最も重要な役割は、細胞が生きていくために、細胞内の恒常性を保つことであるが、具体的には、細胞内の物質の拡散を防ぐこと、また、細胞内外の物質を選択的に透過させることなどが挙げられる。脂質二分子膜は疎水性であり、イオンその他の親水性分子をほとんど通さない。これら細胞内に取り込む際には、チャネルタンパクや運搬体タンパクを介し、特異的に行われる。

人工脂質二重層に対する分子の透過性について既に知られている。人工脂質二重層を透過できる物質と出来ない物質について、図8にまとめた。

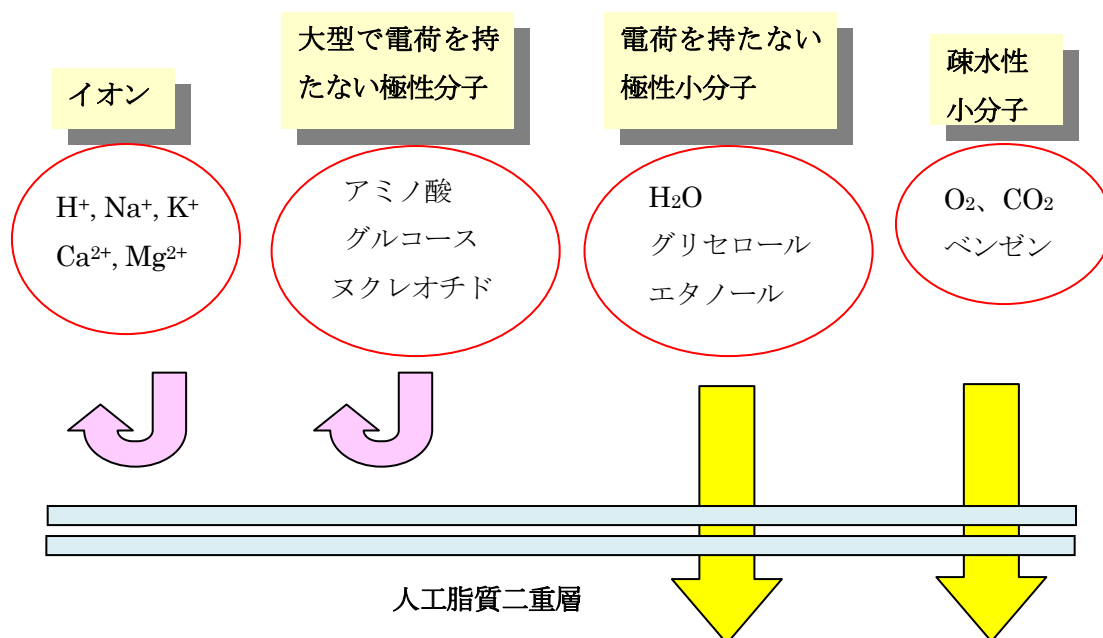


図8 人工二重層に対する分子の透過性

一般的に用いられている低分子量の薬剤は、自由拡散によって細胞膜を通過できるものも数多い。しかしながら、それらが細胞膜をどのようにして透過できるかは、明らかになっていない。

3.3 リオトロピック液晶を用いた細胞内へのデリバリーシステム

細胞膜に含まれるリン脂質は、生体に対して毒性が低いと考えられており、ドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System: DDS)のドラッグキャリア成分として使用されている。リン脂質を導入したキャリアで薬物を内包した系が、リン脂質を導入しない系に比べて、細胞内への取り込み量が増加したという報告もある[11]。このように、キャリアにリン脂質を含む DDS 製剤の一つに、2007 年に日本で承認された代表的な DDS 抗ガン剤ドキシル®がある。これはドキシソルビシン塩酸塩を、水溶性の高分子ポリエチレングリコールで修飾したリン脂質二分子膜リポソームに封入した薬剤である[12]。メトキシポリエチレングリコール部位の親水性により細網内皮系に異物として認識されにくい特徴があり、腎臓での代謝で排除されにくいいため、より長く生体内に留まり血中循環時間が延長することが報告されている[12]。

最近になって、ドキシル®の細胞内への取り込みメカニズムが報告された[13]。この報告によると、ドキシル®の細胞内浸透は、細胞膜表面に存在し杯状構造をしているカベオラ部位で行われ、カベオラ膜が形態変化してできる小胞体による取り込み(エンドサイトーシス)によって起こる。図 9 に示すように、カベオラ膜を介して細胞内へ取り込まれるには、薬剤は、カベオラ部位と相互作用した後、細胞膜の形態変化によって包み込まれ細胞内へ取り込まれる。カベオラ部位における、薬物と細胞膜の相互作用は、薬物とそこに自己集合する細胞膜内のタンパク質等との親和性に起因すると考えられる。エンドサイトーシスにおいても細胞膜の液晶性が重要な役割を果たしていると考えられる。

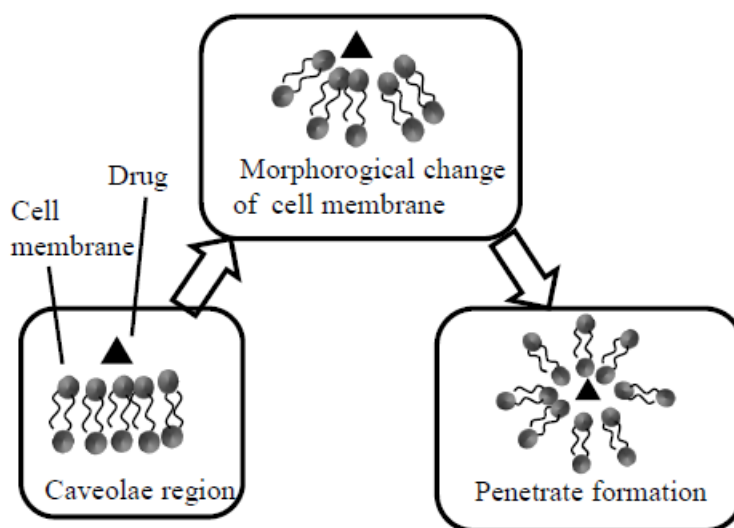


図 9 カベオラを介したエンドサイトーシスの模式図

次に、微生物によりつくりだされる両親媒性脂質バイオサーファクタントであるマンノシルエリスリトールリピッド(MEL)が示す顕著な細胞内への浸透について述べる。MEL は、白血病細胞に対する増殖抑制作用や他の血球への分化誘導、そして皮膚ガンのマウスメラノーマ細胞に対して自発的な細胞死(アポトーシス)を誘起することが報告されている[14]。図 10 に MEL の構造を示す。

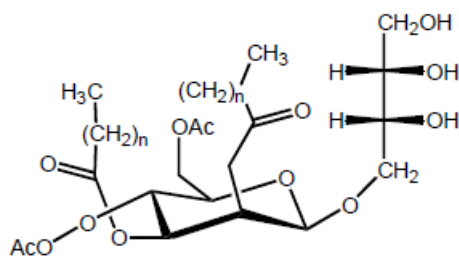


図 10 マンノシルエリスリトールリピッドの分子構造

リン脂質や陽イオン性コレステロール誘導體と MEL を組み込んで形成させたリポソームをキャリアとして細胞株へ遺伝子導入を試みたところ、従来の市販リポソームに対して 50~70 倍もの導入効率を示し、細胞内へ高い浸透性をもつことが分かった[15]。さらに、その高い浸透性は細胞膜との融合によって促進されることが報告されている[16]。高い細胞内浸透性をもつ MEL の臨界凝集濃度 (Critical aggregate concentration : CAC) は 2.7 μM と非常に小さく[17]、スポンジ相、キュービック相およびラメラ相といった液晶相を幅広い濃度範囲および温度範囲で形成する。MEL の高い液晶性が細胞内浸透に重要な寄与をしていると考えられる。

近年、脂質からなるリोटロピック液晶を用いた DDS も活発に研究されている。研究対象としては、オレイン酸グリセリル(Glyceryl monooleate : GMO)などの両親媒性脂質が頻繁に用いられている。このような両親媒性脂質は、水の添加量を変えることで集合状態を変えることが可能で、ラメラ相、双連続キュービック相および逆ヘキサゴナル相といった多様な液晶相を形成できる。特にキュービック相のような非ラメラ型の液晶構造は、生体内でも形成されており、タンパク質の機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられている[18]。Boyd らは、両親媒性脂質である GMO で薬剤をコーティングすることによって、黄斑変性症に用いられる薬剤の溶解性の改善を試みている[19]。また、Mezzenga らは、リノール酸グリセリルと pH 感応性のリノール酸、そして親水性のモデル薬剤であるフロログルシノールを用いて、口腔内、胃といった異なる生体部位で、その部位に依存した pH 変化によって起こる液晶構造の制御を利用した DDS を提案している[20]。

脂質を分散させた液晶エマルジョン構造をキャリアに利用した DDS も活発に検討されている。キュービック相分散微粒子である cubosome は 1996 年に Gustafsson らによってつくりだされた[21]。Cubosome の構造[22]を図 11 に示す。双連続構造に含まれる脂質二分子膜中の疎水性部分、脂質の極性頭部や水チャンネルの親水性部分、そして水と脂質の界面付近の両親媒性部位で、それぞれ疎水性薬物、親水性薬物、両親媒性薬物を捕捉できると考えられる。

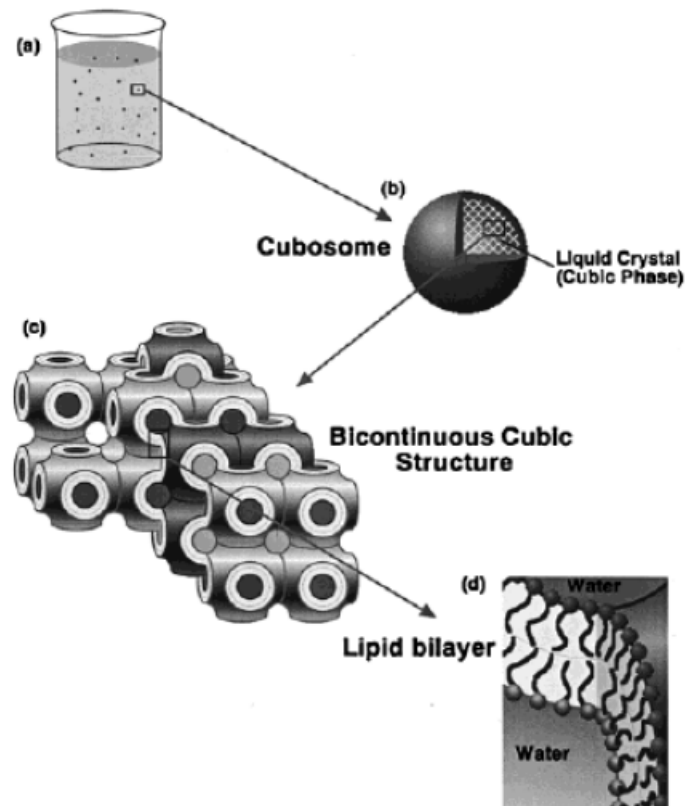


図 11 cubosome の形成スキーム

(a)水中での cubosome

(b)形成された cubosome

(c)cubosome に含まれる双連続キュービック相の構造

(d)脂質二重層によって隔てられた水のチャンネル

4. 液晶性を有する薬

これまで述べてきたように、多彩な機能を有する生体膜がリオトロピック液晶であることから、液晶性と生体系の機能との関連に興味を持たれている[23]。しかしながら、これまでに液晶性化合物の薬理活性作用に関する報告は極めて少ない。一方、臨床で使用されている薬のリオトロピック液晶性を評価した報告に注目すると、リオトロピック液晶性を示す薬剤は増えつつある[24]。さらに、そのようなリオトロピック液晶性を示す薬剤には、抗炎症剤である fenoprofen、抗菌剤である itaconazole、抗生物質である nafcillin、抗ガン剤である methotrexate と非常に多様である。図 12 に液晶性と関連がある薬剤の化合物の構造および発現した液晶相の種類を示す。このような液晶性を有する薬剤をまとめるにあたり、Stevenson らは、サーモトロピック液晶性を有する薬剤はの報告は少ないと述べている[24]。

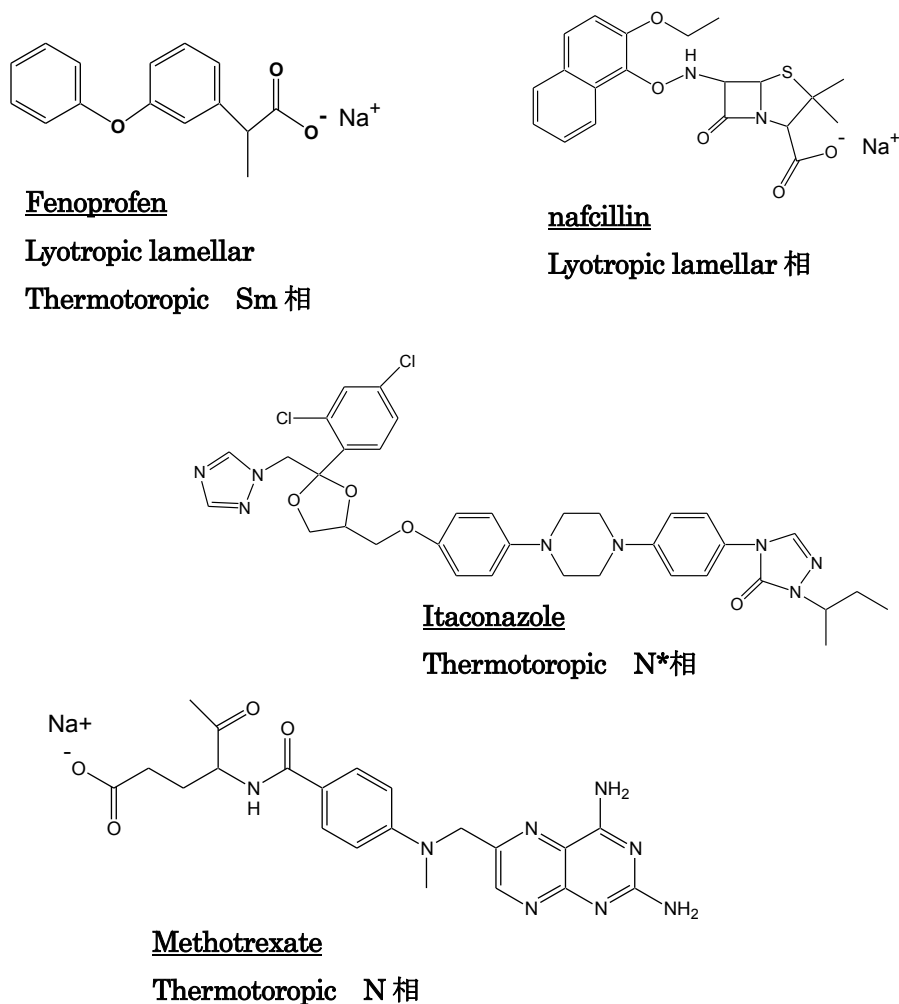


図 12 液晶性を示す薬剤の化学構造

図 12 に示したメトトレキサートは、代表的な分子標的薬の一つで、白血病の治療薬である [25]。メトトレキサートの構造を図 13 (a)に示す。メトトレキサートは、濃度勾配に逆らって薬物濃度の高い方へ移動する能動輸送によって細胞膜を透過する。そして、葉酸(図 13 (b))と拮抗し合うことで、葉酸が酵素と結合することを妨げ、ガン細胞の DNA 合成を阻害し細胞増殖を抑制する。この拮抗はメトトレキサートと葉酸の分子構造が似ていることに起因している(図 13)。一方、葉酸はリオトロピック液晶性として、キラルネマチック相とカラムナー相を発現し、サーモトロピック液晶性としてディスコチック相やスメクチック相を形成できる。メトトレキサートは、サーモトロピックネマチック相を発現する[25]。両者の個々の分子構造の類似性のみならず、共に集合体形成能を有することも、両者の拮抗に関与している可能性がある。

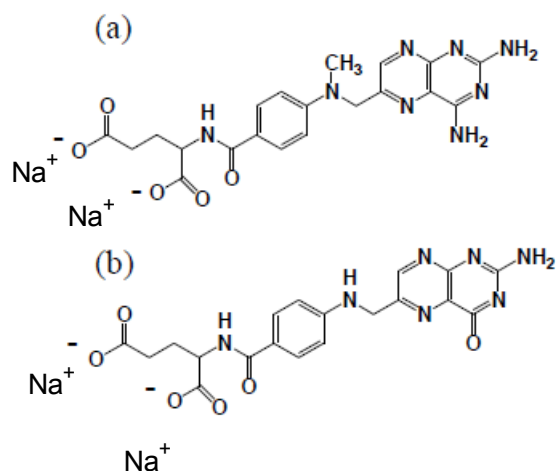


図 13
 (a)分子標的薬メトトレキサートの分子構造
 (b)葉酸の分子構造

5. 細胞周期

1953年にWatsonとCrickによってDNA二重らせんモデルが発表されたことによって、遺伝情報、遺伝子、染色体、DNAという原理がまとめられていった。そのような中でHowardとPlecが、マメ科植物の根の細胞分裂において、DNAの合成が起こるのは、ある特定の時期だけであることを見つけた。この発見が、細胞分裂において、DNA合成前、合成中、DNA合成後という、三つの異なった位相が存在することを明らかにし、「細胞周期」という新たな概念を生み出した。

細胞周期の機能は、DNAを正確に複製し、遺伝的に同一である娘細胞へ遺伝情報を分配することである。細胞周期は4つに分けられる(図14)。細胞分裂に必要な核DNAの複製を行うS期、有糸分裂及び細胞質分裂を行うM期、そして、M期とS期の間には、G1期とG2期がある。G1期およびG2期では、細胞内外の環境が適切であるかどうか、次の段階へ進む準備はできたかどうか監視を行っており、チェックポイントと呼ばれる。また、細胞が傷害を受けるなどして、DNA断片化が引き起こされた細胞(死細胞)は、細胞周期上にとどまることはできず、SubG1期に分類される。細胞周期を図14に示す。

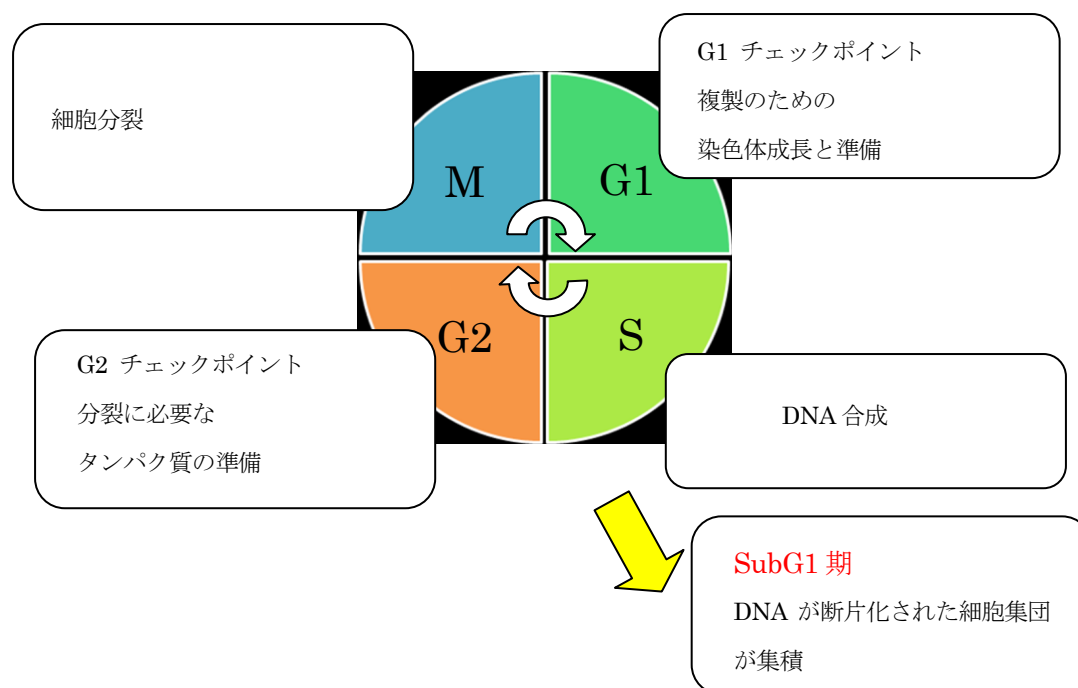


図14 細胞周期と分裂過程

細胞はまた、細胞分裂により増殖するばかりではない。生きていくうえで不要となると、自発的に細胞死を引き起こす。これはアポトーシスと呼ばれる。このようにして、細胞数は細胞分裂の速度と、細胞死の速度とを厳密に制御しながら一定に保たれる。細胞周期の進行には、サイクリンというタンパク質が、CDK (cyclin dependent kinase) と複合体を形成することが必要であるが、このとき、リン酸化および脱リン酸化がによって、シグナルが伝達されている。

6. アポトーシスに関与する細胞内シグナル伝達経路

細胞周期の進行過程でもみられるように、細胞内では様々なシグナルが伝達されている。その中でも、外界からの刺激、細胞の増殖や分化、そしてアポトーシスなど幅広い関与が認められているのが、mitogen-activated protein kinase (MAPK)である。MAPKの中で、extracellular signal regulated kinase (ERK)は細胞増殖や分化といった生存に関わるシグナルである。c-Jun N-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK)および、p38(pはprotein、38は分子量[kDa]を意味する)はストレスに応答するタンパク質である。JNKやp38といったストレス応答タンパクの発現が活性化されれば、細胞はダメージを受けることになるが、JNKやp38の活性化によりすぐアポトーシスが引き起こされるわけではない。また、JNKやp38を活性化するストレスは、細胞外からの刺激のほかに細胞内で発生する活性酸素種も含まれ、ストレス要因は一つに特定することはできない。シグナル伝達経路の下流で、最終的にアポトーシスを実行に導いているタンパク質群は、cystein protease (caspase)ファミリーである。Caspaseはこれまでに14種類同定されている。Caspaseファミリーによるアポトーシスの誘導には大きく分けて2通りある。一つは、ミトコンドリアを介するもので、もう一つはアポトーシスに直接つながる death receptor (DR)を介するものである。まず、ミトコンドリアを介する場合、何らかのストレスなどによりミトコンドリアが刺激を受け、ミトコンドリア膜の亢進性が低下し、アポトーシス誘導タンパク質であるシトクロム c を産生する。これにより、pro-caspase-9、caspase-9と順に活性化し、次に caspase-3、-6、-7のいずれかもしくは複数活性化するアポトーシスが引き起こされる。また、DRを介する場合には、caspase-8または9、そして caspase-3、6、7のいずれかもしくは複数活性化するアポトーシスが起る。Caspaseファミリーによるアポトーシス誘導を図15にまとめた。

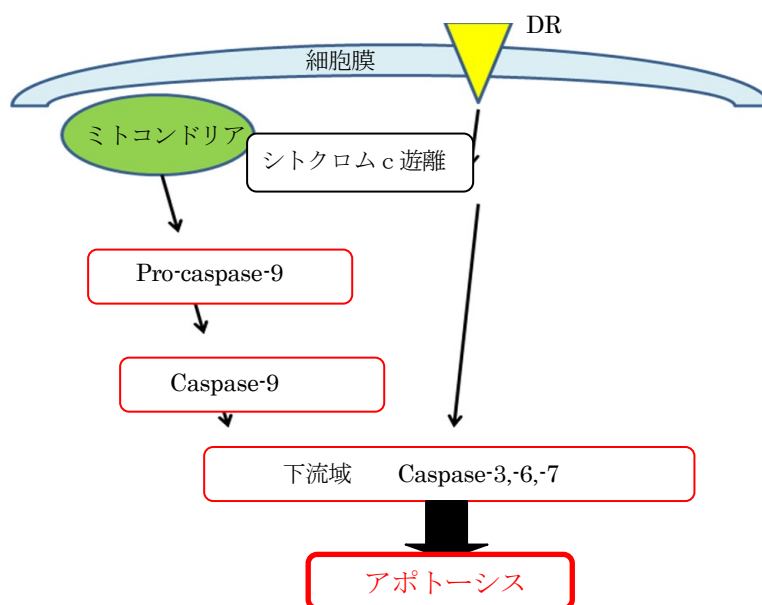


図15 Caspaseファミリーカスケードによるアポトーシス誘導

7. がん化学療法と血小板減少症

正常細胞には正常遺伝子とがん遺伝子が共存している。特に、がん細胞とはがん遺伝子が何らかの影響で変異し、本来一定に保たれているはずの分化、増殖能の制御が不可能となり増え続けることで、周囲の正常細胞の生存さえも脅かしてしまう。このような細胞がん化において、細胞の増殖は細胞周期を逸脱している。がん抑制遺伝子である p53 はがん組織で最も高頻度に変異が見られ、p53 を標的分子としたがん化学療法も活発に進められている。

造血器腫瘍の化学療法において、細胞周期特異的な薬剤と非特異的な薬剤とに大きく分けられる。このような細胞周期特異的な薬剤に関して、細胞周期上の主な作用点について、図 16 にまとめた。

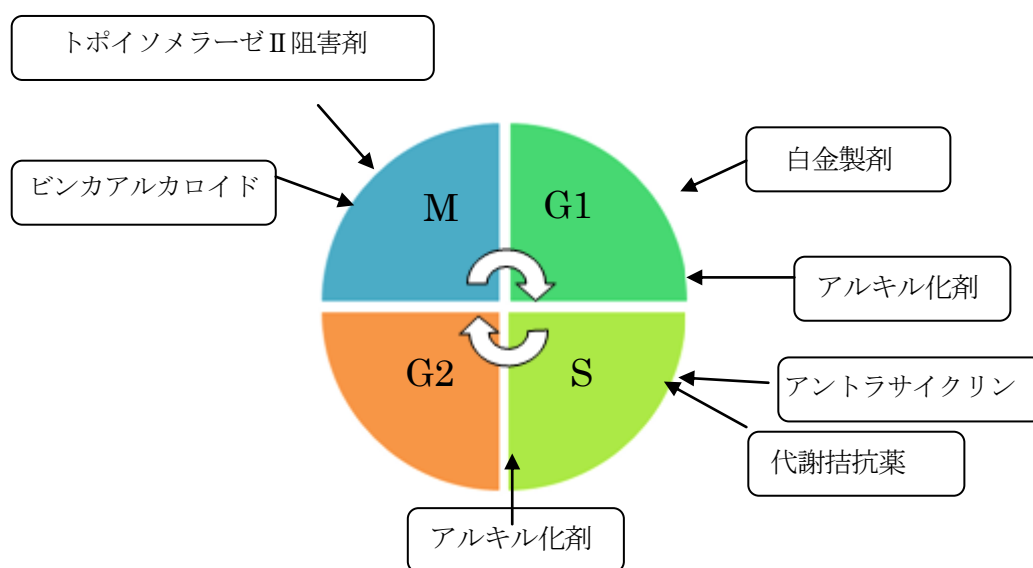


図 16 細胞周期特異的な抗がん剤

抗腫瘍剤は投与されることで全身に効果を及ぼすことから多くの毒性が発現する。そのため、今後の化学療法としては、標的であるがん細胞に対してのみ作用し、正常細胞に毒性を示さないような薬剤が求められる。また、がん化学療法における副作用のひとつに血小板減少症が挙げられる。数多くの血小板造血薬が臨床試験されてきたものの、未だに血小板造血薬はなく、濃厚血小板輸療法に頼る場合が多い。

8. 本研究の目的

液晶性化合物は、これまでディスプレイ材料として積極的に開発が進められてきた。一方、生体内には細胞膜などの生体組織に多くの液晶状態が存在していることが知られている。液晶性を有する細胞膜は非常に動的で、絶えず形態を変化させながら情報伝達や物質の輸送を行っている。情報伝達を行うために、細胞膜内に存在する膜タンパク質などの情報伝達分子は、膜の流動性を利用して自己集合し、伝達部位をより局在化することで伝達効率を高めている。このように、液晶性は、ディスプレイ表示技術において優れた機能を付与するばかりでなく、生体機能の発現にも大きく寄与している。

細胞膜が両親媒性分子のリン脂質を主成分とし、リオトロピック液晶を発現することから、生体の機能とリオトロピック液晶性との関わりに興味を持たれている。また細胞膜との親和性に着目して、リン脂質などの両親媒性脂質をキャリアとしたドラッグデリバリーシステムの開発も進められている。

現在、低分子化合物を用いた分子標的抗がん剤や、血小板造血薬の開発が注目されている。薬剤の示す液晶性は、薬剤の生体内での安定性、溶解性、溶出速度、代謝といった薬剤の機能に関与していると考えられる。米国製薬会社 Nektar 社の Stevenson らはいくつかの既存の薬剤のサーモトロピック液晶性およびリオトロピック液晶性を調べまとめている。最近には薬剤の生体内での代謝過程に必要な胆汁塩に関連する液晶性についての報告もある。しかしながら、実際に使われている薬剤におけるリオトロピック液晶形成の報告例は少なく、その薬剤において発見されたリオトロピック液晶性について、詳細な検討は行われていない。液晶性化合物の薬理活性作用を調べることで、薬剤として機能を生み出せる可能性がある。

そこで本研究では、生体機能の発現に液晶性が重要な役割を果たしていることに着目し、液晶性化合物の薬剤としての応用を目指して、ヒト由来の細胞を用いて、液晶性化合物の薬理活性作用について検討を行った。リード化合物を得ることで、近年、複雑化する薬剤開発に対して、新たな薬剤分子の設計指針を提案することを目的とした。

9. 参考文献

- 1 Reinitzer F, *Monatsh. Chem.*, **9**, 462 (1888).
- 2 Lehmann O, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **4**, 462 (1889).
- 3 K. J. Zuzak, M. D. Schaeberle, E. N. Lewis, I. W. Levin : *Proc. SPIE*, 3918, 17 (2000).
- 4 Goodby J, Mehl G, Saez I, Tuffin R, Machenzie G, Auzely-Velty R, Benvegna T, Plusquellec D, *Chem. Commun.*, 2057 (1998).
- 5 Saez I, Goodby J, *J. Mater. Chem.*, **15**, 26 (2005).
- 6 Tschierske C, *J. Mater. Chem.*, **11**, 2647 (2001).
- 7 Tschierske C, *J. Mater. Chem.*, **8**, 1485 (1998).
- 8 川村泰彬, 岡野光治, 液晶便覧, 液晶便覧編集委員会編, 丸善株式会社, 439-440 (2000).
- 9 Singer J, Nicolson L, *Science*, **175**, 720 (1972).
- 10 梅田真郷, 山路顕子, 生体膜のダイナミクス, 日本物理学会シリーズ・ニューバイオフィジックス刊行委員会編, 共立出版株式会社, 100-106 (2000).
- 11 N. Tang, G. Du, N. Wang, C. Liu, H. Hang, W. Liang : *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1004 (2007).
- 12 A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely : *Cancer Res.*, **54**, 987 (1994).
- 13 G. Sahay, J. O. Kim, A. V. Kabanov, T. K. Bronich : *Biomaterials*, **31**, 923 (2010).
- 14 D. Kitamoto, H. Isoda, T. Nakahara : *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (2002).
- 15 Y. Inoh, D. Kitamoto, N. Hirashima, M. Nakanishi : *J. Contr. Release*, **94**, 423 (2004).
- 16 Y. Ueno, Y. Inoh, T. Furuno, N. Hirashima, D. Kitamoto, M. Nakanishi : *J. Contr. Release*, **123**, 247 (2007).
- 17 T. Imura, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, H. Negishi, H. Yanagishita : *Chem. Eur. J.*, **12**, 2434 (2006).
- 18 J. R. Giorgione, Z. Huang, R. M. Epand : *Biochemistry*, **37**, 2384 (1998).

- 19 A. Tilly, D. A. Morton, T. Hanley, B. J. Boyd : *Current Drug Delivery*, **6**, 322 (2009).
- 20 R. Negrini, R. Mezzenga : *Langmuir*, **27**, 5296 (2011).
- 21 J. Gustafsson, H. Wahren, M. Almgren, K. Larsson : *Langmuir*, **12**, 4611 (1996).
- 22 M. Nakano, A. Sugita, H. Matsuoka, T. Hanada : *Langmuir*, **17**, 3917 (2001).
- 23 J. Goodby, V. Görtz, S. Cowling, G. Mackenzie, P. Martin, D. Plusquellec, T. Bevegnu, P. Boullanger, D. Lafont, Y. Queneau, S. Chambert and J. Fitremann, *Chem. Soc. Rev.*, **36** 1971 (2005).
- 24 C. Stevenson, D. Bennett, D. Lechuga-Ballesteros, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1861 (2005).
- 25 A. Fatta, J. Zhang, D. B. Bennett, D. Lechuga : *Pharm. Sci.*, **4**, M1286 (2003).

第一章 液晶性化合物によるヒト巨核球及び血小板産生促進作用

§ 1. 緒言

化学療法や放射線療法による癌治療において、副作用として骨髄抑制が起こることが知られており、このような骨髄抑制は、造血機能や免疫低下を引き起こす。造血機能の低下に対応するために、白血球や赤血球の産生を促進する薬剤が臨床応用されているが、重篤な血小板減少症に対しては、臨床応用されている薬剤はなく、濃厚血小板製剤を輸血することで治療を行っている[1]。しかしながら、濃厚血小板製剤の輸血を繰り返し行うことで、ヒト白血球型抗原の組織不適合が生じ、難治性の状態が引き起こされる。さらに、ウイルス感染というリスクもある。

血小板は、造血幹細胞から分化した巨核球が、成熟・多倍化し成熟巨核球となり、その成熟巨核球から産生放出されるが、この産生過程を促進する巨核球・血小板造血因子としてトロンボポエチン(Thrombopoietin: TPO)がある。TPO は、1994 年にクローニングされており、多くの国で、臨床応用が検討されてきた[2, 3]。しかしながら、TPO に対する中和抗体の産生や血小板減少症が引き起こされるといった問題点が見つかったことで、臨床応用が難しいと考えられている[4]。そこでこの問題点を解決するためには、新たな因子が求められている。TPO は 332 アミノ酸残基からなる遺伝子組み換え型糖タンパク質であるが、この TPO 様の活性を示す低分子化合物の探索が行われており、低分子ペプチド、非ペプチド化合物などが開発されている[5-7]。

一方、ディスプレイ材料として優れた特性を示す液晶性化合物の開発が進められているが、液晶性化合物の薬理活性作用についてはこれまでに報告が少ない[8, 9]。両親媒性液晶化合物は、細胞膜の構成要素であるリン脂質と同様に親水部位と疎水性部位をもっていることから、細胞膜と親和性をもつことが示唆される。また、液晶性化合物は磁場や電場で配向する特性を有することから、機能的な薬剤となる可能性や医療分野で応用されることが期待される。

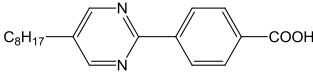
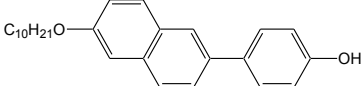
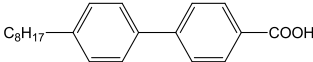
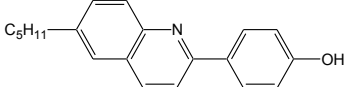
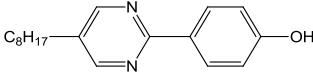
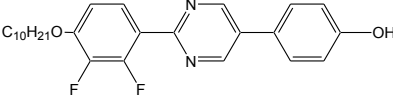
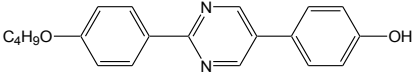
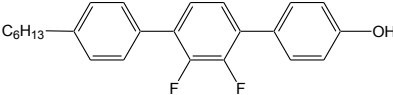
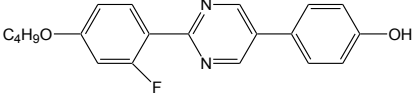
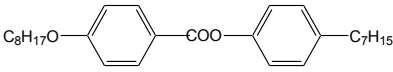
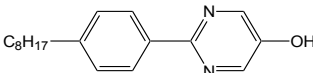
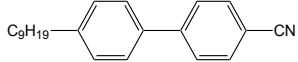
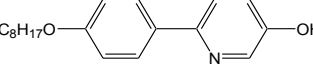
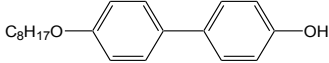
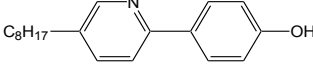
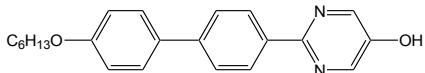
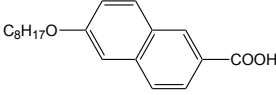
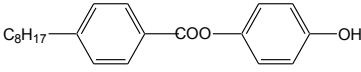
これまでに、本研究室の寺澤らが、ヒト胎盤及び臍帯血から得た造血幹細胞である CD(cluster of differentiation: CD)34 陽性細胞を用いて、液晶性化合物の巨核球産生や血小板産生に及ぼす影響を調べてきた。20 種類にわたる液晶化合物を、臍帯血由来の CD34 陽性細胞のクローニング増殖に対して評価した結果、巨核球前駆細胞の増殖を促進する化合物が得られ報告している[10]。しかしながら、巨核球から血小板が産生される過程を促進することはできなかった。臍帯血から得た造血幹細胞を巨核球へ分化させることは難しいと考えられている[11, 12]。骨髄や臍帯血から得た造血幹細胞や造血前駆細胞は、末梢血から得たものに比べ、より成熟している[13, 14]。本研究では、血小板産生を促進する液晶化合物を探索する目的で、末梢血から単離・精製した CD34 造血幹細胞を用いて、液晶性化合物の血小板産生過程に及ぼす影響を調べた。

§ 2. 実験

2.1. 液晶性化合物と抗体

実験に使用した 18 種類の液晶性化合物の構造を表 1-1 に示す。化合物 1、3-6 および 12 はみどり化学 (株)、15 は BDH Chemicals (Atherstone, Warwickshire, UK) 及び関東化学 (株) より購入した。その他の化合物は(株)ジャパンエナジー(現: JX 日鉱日石エネルギー(株))で合成されたものである。各化合物はジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide: DMSO)に溶解し培地に添加した。

表 1-1 薬理活性評価に用いた液晶性化合物の分子構造

Compound	Molecular structure	Compound	Molecular structure
1		10	
2		11	
3		12	
4		13	
5		14	
6		15	
7		16	
8		17	
9		18	

ヒト遺伝子組み換え型トロンボポエチン(thrombopoietin: TPO)、ヒト顆粒球マクロファージ刺激因子(Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor: GM-CSF)、インターロイキン(IL-3, IL-6, IL-11)は Biosouce (Japan)より購入した。添加量は、TPO, 50 ng/ml; GM-CSF, 1 ng/ml; IL-3, 100 ng/ml; IL-6, 50 ng/ml; IL-11, 100 ng/ml とした。蛍光標識のために用いたモノクローナル抗体は、fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-human CD34 (FITC-CD34)、FITC-conjugated anti-human CD42a (FITC-CD42a)、phycoerythrin-conjugated anti-human CD62p (PE-CD62p)、Mouse FITC-IgG₁、FITC-IgG_{2a} であり、Beckman-Coulter 社(Marseille, France)から購入した。Mouse FITC-IgG₁ と FITC-IgG_{2a} はアイソタイプコントロールとして用いた。

2.2 CD34 陽性細胞の分離

本研究では、ヒト由来の末梢血から造血幹細胞を使用する。末梢血の入手および造血幹細胞を使用する実験は、弘前大学医学部医療倫理委員会から承認を受けて行ったものである。

母親からインフォームドコンセントの得られた正期産、正常妊娠分娩を対象として、青森日本赤十字センターにおいて集められた末梢血(Peripheral Blood: PB)をから造血幹細胞である CD34 陽性細胞を分離した。まず、バフィーコートを単離し、Lymphosepar I (1.077 g/ml; IBL, Fujioka, Japan)中で、低密度遠心分離により単核球を分離した。その後、5 mM EDTA を含むリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)で3回洗浄した。CD34 陽性細胞の細胞内成分を magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Germany)で濃縮した。このとき、CD34 陽性細胞の純度が十分高くなるまで、磁気ビーズカラムを3回繰り返し行った。こうして精製した全単核細胞中の0.1%から、実験に使用する CD34 陽性細胞を得た。実験に使用した CD34 陽性細胞における CD34 発現率は、フローサイトメーター (EPICS-XL, Bscckman-Coulter, Tokyo, Japan)により解析し、88-95%の細胞で発現を観察した。

2.3. 液体培養方法

各液晶性化合物の CD34 陽性細胞の増殖分化に及ぼす作用を検討するために、まず、液晶性化合物の 10mM DMSO 溶液を調製し、これをサンプルとした。10mM のサンプルを培地に添加し、培地中の最終濃度が 100 nM となるようにした。末梢血($2-3 \times 10^4$ cells/ml)を TPO 存在下、2%ヒト血清含イスコフ改変ダルベッコ培地(Iscove's Modified Dullbecco's Medium: IMDM)培地で培養した。IMDM 培地には BIT9500(Stem cell technology, Vancouver, Canada)を加えた。5%CO₂ 存在下、37°C で 14 日間培養したのち、7 日目にサンプルもしくはサイトカインを添加した。サンプルとサイトカインの代わりに、DMSO を添加したものをコントロールとした。培養後はトリパンブルー染色により生細胞数を決定した。巨核球の数は CD42 陽性と成っている細胞数から求めた。

2.4. 免疫学的表面抗原の測定法

細胞表面に存在する抗原の発現は、免疫蛍光フローサイトメトリーにより行った。FITC-CD34、FITC-CD42a の抗体を含むモノクローナル抗体を用いた。培養前の CD34 陽性細胞及び液体培養後に回収された細胞の懸濁液を、それぞれ FITC-CD34、FITC-CD42a の抗体溶液に添加し、暗所室温にて 20 分間インキュベートしたのちに、遠心分離機で洗浄した。Flow-Count 標準粒子を加え、フローサイトメーターを用いて、表面抗原の解析を行った。ネガティブコントロールには、アイソタイプが不適合のモノクローナル抗体を用いた。

2.5. Pro-platelet formation 解析

血小板は成熟巨核球より産生されるが、産生の最終段階で、成熟巨核球は細長い突起を伸ばす。この細長い突起からちぎれるようにして血小板は産生放出される。成熟巨核球が、この細長い突起を伸ばしている状態を Pro-plated formation という。Pro-plated formation の巨核球を plasma-clot 法により解析した。方法は既報に従った[15]。24-well plate をもちい、0.3 ml/well ずつ細胞を播き、5%CO₂ 存在下、37°C でインキュベーションした。12 日後に、aceton/ methanol (2:1) で 15 分間、二回、固定処理をした。プレートは一晩乾燥させ、-20°C で保管した。染色時には、室温まで解凍し、0.5% bovine serum albumin (PBS-B)を含む PBS を加え、その後、FITC-CD41 溶液に置き換えた。1 時間室温でインキュベーションしたのち、PBS-B で洗浄して、PI (0.3 ng/ml, Sigma)で核を染色した。再度洗浄したのちにフローサイトメーターで pro-plated formation を解析した。

2.6. 血小板の機能解析

14 日間培養し、生細胞数をトリパンブルーによって決定したのち、adenosin 5'-diphosphate (ADP, 0.01 mM, Sigma)を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。遠心分離機を用いて細胞を洗浄 (室温、1200 rpm, 5 min)したのち、室温で 20 分間モノクローナル抗体を反応させた。その後、細胞表面の抗原をフローサイトメーターを用いて直接解析し、そのとき、FITC-CD42a、PE-CD62p double-staining を用いた。

2.7. 統計処理

得られた結果がコントロールに対して差があるかどうかを判断するために、有意差検定を行った。本実験では、危険率を 5%とし、Student の *t* 検定で行った。

§ 3. 結果と考察

3.1. ヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞の増殖分化および血小板産生に及ぼす 液晶性化合物の影響

ヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞を、TPO 存在下 plasma clot 法で培養を行った。培養から 7 日後に、液晶性化合物を添加し、培地中の最終濃度を 100 nM とした。化合物の添加後、さらに 7 日間培養し、コントロールに対する細胞数を調べた。結果を図 1-1 に示す。

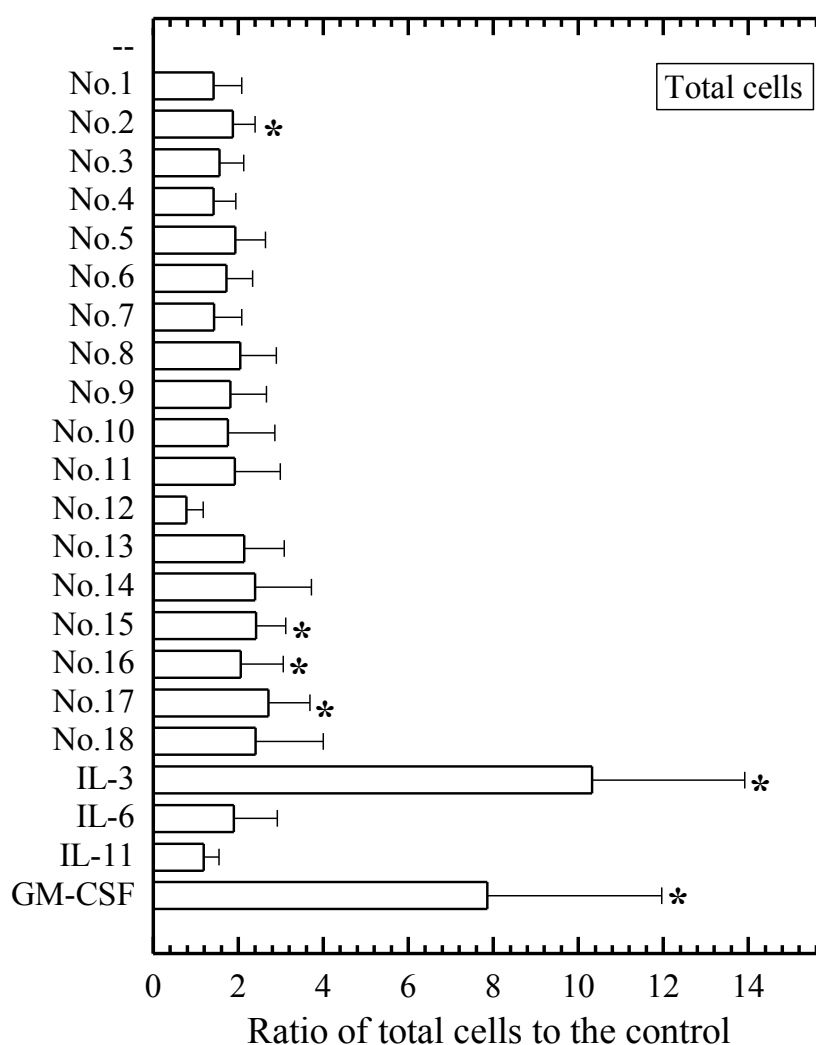


図 1-1 液晶性化合物を添加し、7 日間培養したときのコントロールに対する細胞数の割合。液晶性化合物の培地中の最終濃度は 100 nM とした。

* $p < 0.05$ compared to TPO alone by Student's t test.

化合物 2、15、16、そして 17 において、TPO のみで培養したコントロールに対して細胞増殖促進作用が観察された。コントロールの細胞数を 1 とした場合、それぞれ細胞数を 1.87 倍、2.42 倍、2.06 倍、そして 2.71 倍に増やした。ポジティブコントロールとして用意した IL-3

および GM-CSF を添加した系においては、それぞれ、細胞数は 10.3 倍および 7.9 倍となり、顕著に増加させた。

次に、巨核球数について調べた。巨核球は CD34 陽性細胞が、分化成熟することで形成され、細胞表面にある抗原 CD42a が発現している。CD42a が陽性である成熟巨核球の、全細胞数に対する割合をフローサイトメーターを用いて調べた。その結果を図 1-2 に示す。

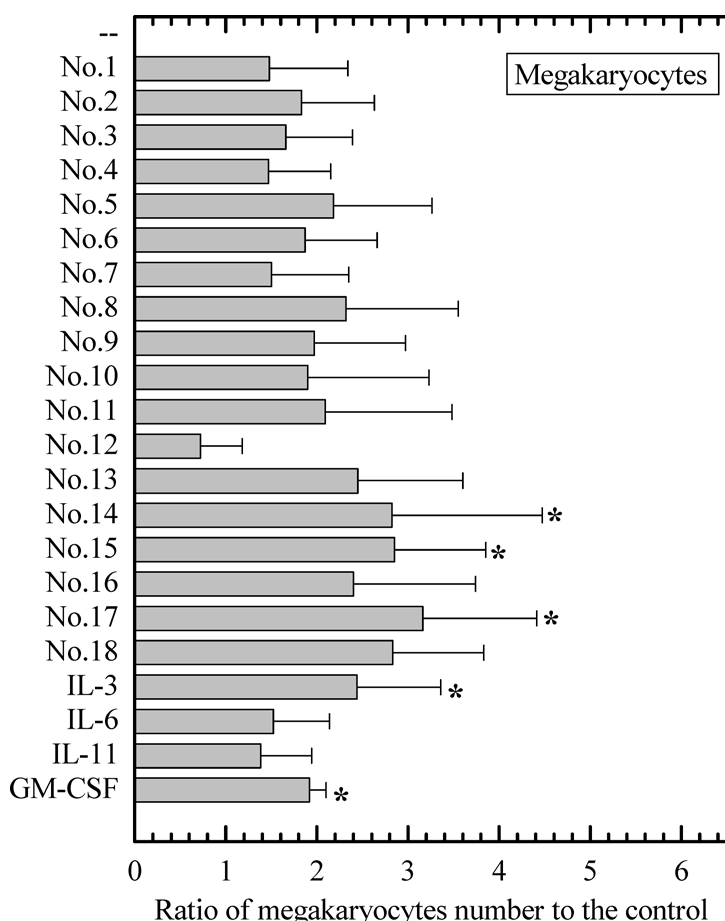


図 1-2 液晶性化合物を添加し、7 日間培養したときの全細胞数に対する CD42a 陽性細胞の割合。液晶性化合物の培地中の最終濃度は 100 nM とした。

* $p < 0.05$ compared to TPO alone by Student's *t*-test.

化合物 14、15 そして 17 が、CD42a 陽性である巨核球の数を有意に増加させ、その数は、全細胞数に対して、2.8 倍、2.9 倍、そして 3.2 倍となった。ポジティブコントロールとして用意した IL-3 および GM-CSF においては、コントロールに対して、2.4 倍および 1.9 倍であった。IL-3 と GM-CSF はいずれも CD34 陽性細胞数を増やし、かつ巨核球の産生数も増やしている。

ここまでの結果をまとめると、IL-3 と GM-CSF のように、CD34 陽性細胞数と巨核球の産生数の両方を増殖させたのは、化合物 15 と 17 であった。一方で、CD34 陽性細胞の増殖を促進した化合物 2 と 16 は、巨核球数は増やしていなかった。また、化合物 14 は、CD34 陽性細胞数を増やしていないにもかかわらず、巨核球数を増やした。これまでに、臍帯血、骨髄、顆粒球コロニー刺激因子によって末梢血から得られた各々の CD34 陽性細胞には、増殖能力や接着分子の発現に違いがみられることが報告されている[16-18]。

最後に液晶性化合物が血小板産生数に及ぼす影響を調べた。結果を図 1-3 に示す。

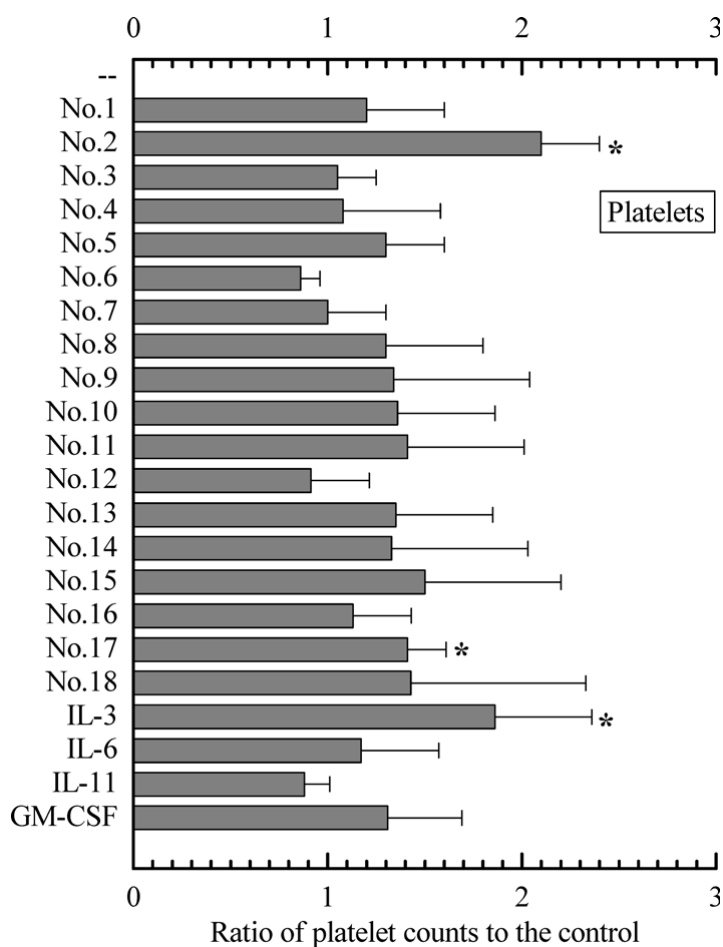


図 1-3 液晶性化合物を添加し、7 日間培養したときのコントロールに対する血小板の割合。液晶性化合物の培地中の最終濃度は 100 nM とした。

* $p < 0.05$ compared to TPO alone by Student's t -test.

血小板は、成熟・多倍化した巨核球からちぎれるようにして産生されていき、CD42 抗体が陽性となっている。そこで、フローサイトメーターで CD42 が発現している粒子の数を血小板とみなし、血小板産生数を調べた。図 3 に示すように、化合物 2 及び 17 が、CD42 陽性である粒子数を顕著に増加させ、コントロールに対して、2.0 倍及び 1.4 倍となった。ポジティブコントロールとして用意した IL-3 においては 1.9 倍であった。1 つの成熟巨核球は、その成熟度に依存して、 1×10^3 から 5×10^3 個の血小板を産生することが報告されている[19]。CD34 陽性細胞から成熟巨核球を経て、血小板が産生される各過程に対して、化合物 17 が影響を及ぼしていた。化合物 2 は巨核球数を増やしていないにもかかわらず、血小板産生は促進できた。化合物 2 と 17 は、IL-3 及び GM-CSF とは異なったメカニズムで作用していると考えられる。また、本実験で用いた CD34 造血幹細胞は末梢血由来のものであるが、これまでの我々の報告によると、臍帯血由来の CD34 陽性細胞に対して、化合物 2 と 17 は、成熟巨核球の増殖を促進していなかった[10]。これらの結果も併せると、末梢血由来及び臍帯血由来の CD34 陽性細胞において、有する増殖能力や接着分子の発現に違いがみられることと、これらの各化合物の及ぼす作用とは相関があり、各化合物の標的細胞が異なっていると考えられる。

3.2. Pro-platelet formation の形成に及ぼす液晶性化合物の影響

図 1-3 に示したように血小板産生において、その産生数を有意に増やした化合物 2 と 17 を用いて、pro-platelet formation の形成に及ぼす影響を調べた。結果を図 1-4 に示す。

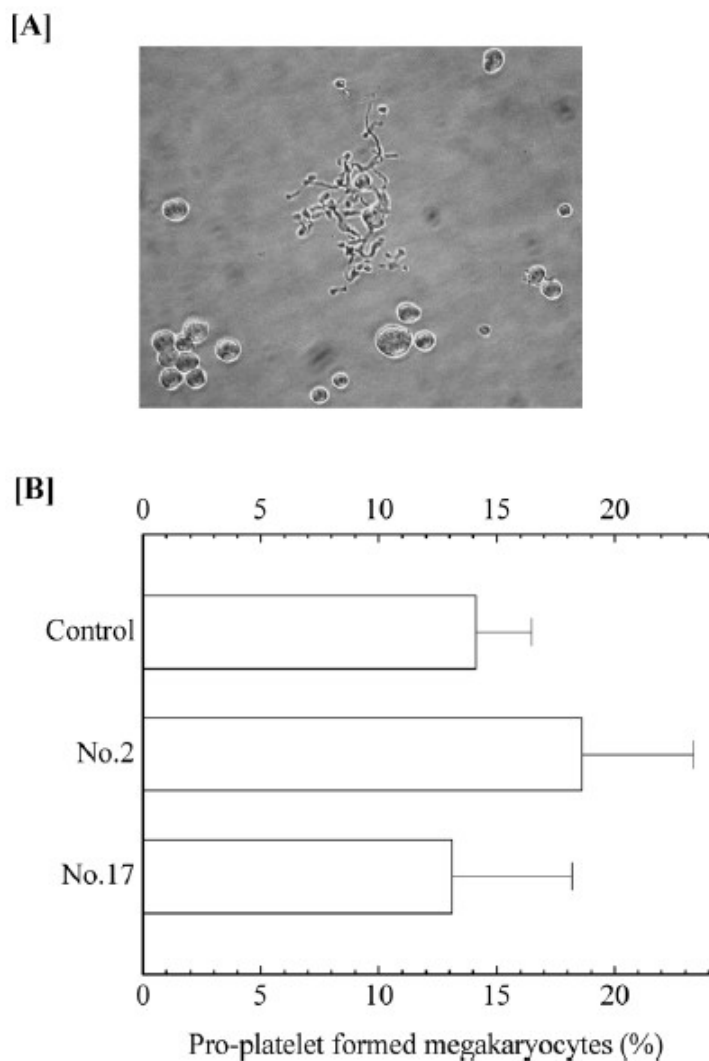


図 1-4 (A)液晶性化合物を添加し、12 日後に観察された pro-platelet formation の写真、(B)コントロールに対する化合物 2 と 17 の pro-platelet formation を形成した成熟巨核球の割合。

図 1-4(A)の写真に示したような短い鎖状の突起が成熟巨核球から伸長している状態を pro-platelet formation という。図 1-3 に示したように化合物 2 と 17 は血小板産生数をコントロールに対して、有意に増加させたものの、pro-platelet formation の形成に関しては、影響を及ぼさず、TPO 単独で培養したものと差がみられなかった(図 1-4 (B))。近年の報告によると、

巨核球から産生される血小板の放出メカニズムには、まだ不明な点が多く、成熟巨核球から血小板が産生放出が **pro-platelet formation** に依存するわけではないことが示されている[20]。また、図 1-4(A)の写真に見られるような、成熟巨核球が短い鎖状の突起が、血小板産生過程で形成される様子は、これまでも報告がある[20-22]。

3.3. 液晶性化合物によって産生促進された血小板の機能解析

CD42a が発現しており、血小板と考えられる粒子を、TPO 存在下、化合物 2 と 17 を添加し培養した。そして、CD42 及び ADP-activated CD62P の発現率をフローサイトメーターにより解析した。結果を図 1-5 に示す。血小板を活性化させるために、ADP を 1 μ M 添加した。

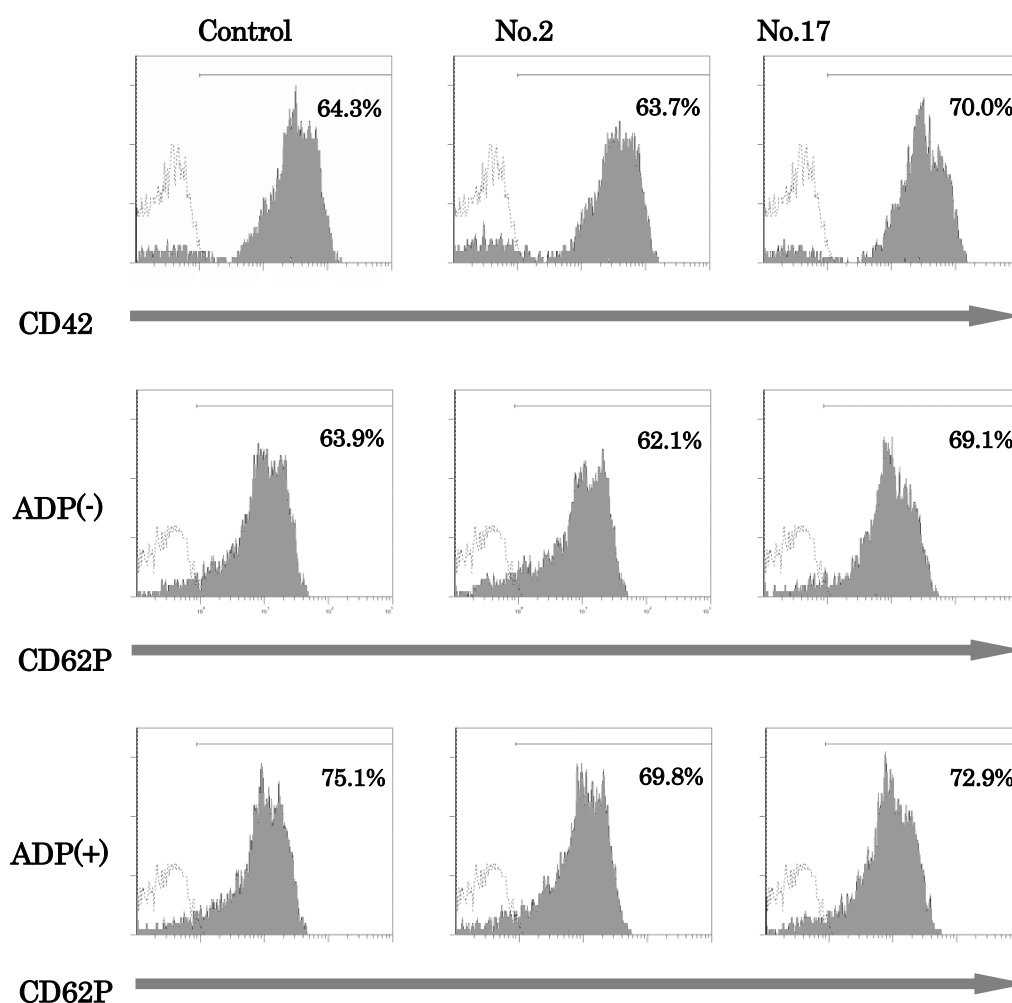


図 1-5 液晶性化合物を添加することで産生促進された血小板表面における CD62P の発現解析

培養前に、CD34 陽性細胞における、CD34 と CD42a 発現率は、それぞれ 89%および 1.5%であったのに対して、培養後、CD34 発現率は 5-6%に激減した。このことから、多数の細胞

が CD42a が発現している巨核球へ分化したことがわかった。化合物 2 及び 17 を添加した場合の CD42 発現率は、TPO 単独のコントロールと差がなかった。次に、産生された血小板の機能について検討した。図 1-5 に示すように、化合物 2 と 17 を添加した系においても、コントロールと同様に、ADP によって CD62P の発現が観察された。よって、化合物 2 と 17 を添加することで産生された血小板の機能は、機能的に生体内のものと同等であると考えられる。

本研究で評価した化合物 2 と 17 は、柔軟なアルキル鎖と剛直な芳香環、そして親水性部位をもっている。このような両親媒性は、リオトロピック液晶の発現に寄与する。しかしながら、血小板産生に及ぼす要因が、分子の両親媒性にあるのか、それに基づく集合体形成能によるものなのかは、本研究においては明らかにすることができず、今後の課題である。

液晶性化合物の血小板産生過程に及ぼす影響を調べた報告は極めて少なく、ヒト巨核球産生および血小板産生過程に新たなメカニズムによって影響を及ぼすことが期待される。さらに、これまでの報告には、20-100 pg/ml TPO ほどで増殖可能なことが示されており[23]、低濃度の TPO と化合物を組み合わせた場合の効果も、血小板産生過程に影響を及ぼしていると予想される。液晶性化合物が、機能的な薬剤として、また、外部刺激に応答できることによる医療応用など、生物学的に応用が発展することが期待される。

§4. 結言

TPO 存在下、液晶性化合物 2 と 17 が CD34 陽性細胞の細胞数を有意に増やし、また、巨核球から血小板産生過程を促進できることが分かった。また、産生促進されてできた血小板は、ポジティブコントロールとして用意した IL-3 や GM-CSF によって産生されたものと同等レベルの機能をもっていたことから、生体内で産生されるものと同等であるとわかった。一方で、化合物 2 は巨核球数の増加には影響を及ぼさないものの、血小板数の増殖促進には影響を及ぼしており、また、化合物 17 は巨核球数及び血小板数のいずれにも影響を及ぼしていた。化合物 2 と 17 は、IL-3 や GM-CSF とは異なったメカニズムで作用していると考えられる。

§ 5. 参考文献

- 1 S. J. Stanworth, C. Hyde, N. Heddle, P. Rebutta, S. Brunskill, M. F. Murphy, *Cochrane. Database Syst. Rev.*, **18**, CD004269 (2004).
- 2 H. Miyazaki, T. Kato, *Int. J. Hematol.*, **70**, 216 (1999).
- 3 Vadhan-Raj S., *Semin. Hematol.*, **37**, 28 (2000).
- 4 R. Basser, *Can. J. Gastroenterol.*, **14** (Suppl. D), 73D (2000).
- 5 K. Inagaki, T. Oda, Y. Naka, H. Shinkai, N. Komatsu, H. Iwamura, *Blood*, **104**, 58 (2004).
- 6 C. L. Erickson-Millar, E. Delorma, S. S. Tian, C. B. Hopson, K. Stark, L. Giampa, E. I. Valoret, K. J. Duffy, J. L. Luengo, J. Rosen, S. G. Miller, S. B. Dillon, P. Lamb, *Exp. Hematol.*, **33**, 85 (2005).
- 7 T. Nakamura, Y. Miyakawa, A. Miyamura, A. Yamane, H. Suzuki, M. Ito, Y. Ohnishi, N. Ishiwata, Y. Ikeda, N. Tsuruzoe, *Blood*, **107**, 4300 (2006).
- 8 C. Stevenson, D. Bennett, D. Lechuga-Ballesteros, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1861 (2005)
- 9 C. Tschierske, *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 1930 (2007).
- 10 R. Terasawa, I. Kashiwakura, A. Yoshizawa, *Yakugaku Zasshi*, **126**, 429 (2006).
- 11 R. Miyazaki, H. Ogata, T. Iguchi, S. Sogo, T. Kushida, T. Ito, M. Inaba, S. Ikehara, Y. Kobayashi, *Br. J. Haematol.*, **108**, 602 (2000).
- 12 M. Ignatz, M. Sola-Visner, L. M. Rimsza, D. Fuchs, J. J. Shuster, X. M. Li, A. Jotwani, S. Staba, J. R. Wingard, Z. Hu, W. B. Slayton, *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **13**, 145 (2007).
- 13 Z. C. Han, J. Briere, J. F. Abgrall, L. Sensebe, D. Parent, G. Guern, *Exp. Hematol.*, **17**, 46 (1989).
- 14 Zauli G., Vitale L., Brunelli M. A., Bagnara G. P., *Exp. Hematol.*, **20**, 850 (1992).
- 15 I. Kashiwakura, M. Kuwabara, O. Inanami, M. Murakami, Y. Hayase, T. A. Takahashi, Y. Takagi, *Radiat. Res.*, **153**, 144 (2000).

- 16 D. R. Sutherland, A. Keating, R. Nayar, S. Anania, A. K. Stewart, *Exp. Hematol.*, **22**, 1003 (1994).
- 17 L. B. To, D. N. Haylock, T. Dowse, P. J. Simmons, S. Trimboli, L. K. Ashman, C. A. Juttner, *Blood*, **84**, 2930 (1994).
- 18 S. van den Oudenrijn, A. E. von dem Borne, M. de Haas, *Exp. Hematol.*, **28**, 1054 (2000).
- 19 J LI, Q Tan, H Yin, H Zeng, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, **9**, 16 (2008).
- 20 G. Kosaki, *Int. J. Hematol.*, **88**, 255 (2008).
- 21 J. M. Radley, M. A. Hartshorn, *Blood Cells*, **12**, 603 (1987).
- 22 P. J. Handagama, B. F. Feldman, N. C. Jain, T. B. Farver, C. S. Kono, *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 962 (1987).
- 23 J. L. Nichol, "Thrombopoiesis and Thrombopoietins," ed. by D. J. Kuter, P. Hunt, W. Sheridan, D. Zucker-Franklin, Humana Press, New Jersey, 1997, pp. 359-375.

第二章 棒状液晶性化合物による慢性骨髄性白血病細胞株 K562 へのアポトーシス誘導

§ 1. 緒言

癌治療の方法の一つに抗癌剤を用いた化学療法がある。抗癌剤は、核酸をアルキル化することにより細胞を致死させるアルキル化剤[1]、核酸やタンパク質合成過程で生成される代謝物と類似した化学構造をもつことによって、DNA や RNA の合成過程を阻害する代謝拮抗薬[2]、細胞骨格を形成する微小管の形成を阻害する植物アルカロイド[3]、そして、DNA 鎖に架橋を形成して細胞を傷害する白金製剤のシスプラチン[4]など多岐にわたる。近年、標的分子に特異的に結合し効果を発揮する分子標的薬の発展が目覚ましく、注目されている。このような分子標的薬には、ガン細胞表面の特異的な抗原に結合することを利用したモノクローナル抗体やその誘導体[5,6]、そして、細胞の分化、増殖に関与する酵素であるチロシンキナーゼの活性化を阻害する低分子化合物[7]などがある。分子標的薬は標的とする分子に対して特異的に作用することから、従来の高い毒性をもつ抗癌剤よりも副作用が軽減できる。

代表的な分子標的薬の一つに、慢性骨髄性白血病治療薬 Imatinib Mesilate がある。これは 1996 年に Druker らによってデザインされた低分子化合物である (図 2-1) [8]。慢性骨髄性白血病 (Chronic myeloid leukemia:CML) は、ヒト白血病ガン遺伝子のうち、9 番染色体上に存在する Abl 遺伝子と 22 番染色体上に存在する Bcr 遺伝子とが、何らかの原因で相互転座した際に、融合してできた Bcr-abl 遺伝子によって産生された Bcr-Abl チロシンキナーゼが、異常な細胞増殖を引き起こす疾患である。Imatinib Mesilate はこの Bcr-Abl チロシンキナーゼの活性化を阻害することで抗腫瘍効果を発揮できる[7]。

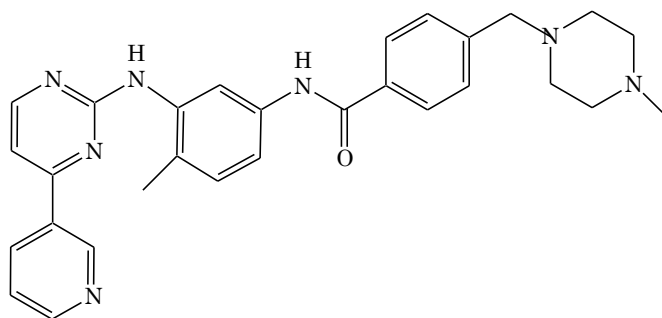


図 2-1 分子標的薬 Imatinib Mesilate の化学構造

しかしながら、Imatinib Mesilate を投与した患者において薬剤に対する耐性が確認された。耐性を示したあとに発症する二次性白血病に対する分子標的薬スプリセルも開発されたが、いまだに完治できる薬剤の開発に至っておらず、新たな抗癌剤が求められている。分子標的薬が効果を発揮するには、タンパク質の特異的な部位に結合することが必要であり、タンパク質に結合するまでに、細胞膜を通過することが必要である。細胞膜は細胞内外の環境を区別し、細

胞内の恒常性を保つという重要な役割に加え、細胞内へシグナルを伝達するための受容体や膜貫通タンパク質を保持している。一方、細胞膜は、液晶状態で存在することから、生体内の機能と液晶性との関わりは大変興味深い。また、慢性骨髄性白血病治療薬であるメトトレキサートの液晶性や、その他既存の薬剤の液晶性についても報告があり、液晶性と薬理活性との興味もたれている [9]。

本研究室では、肺ガン細胞株 A549 を用いた液晶性化合物の薬理活性評価において、液晶性を示さない前駆体がガン細胞の増殖を抑制しなかったのに対して、その前駆体を用いて合成した液晶性化合物においては細胞増殖抑制作用が確認できたことから、抗腫瘍効果と液晶性との相関を報告している[10]。また、第一章で述べたように、棒状の液晶性化合物が血球系の細胞に対して、薬理活性作用を示すことがわかった。そこで、本研究では、第一章で薬理活性作用を調べた棒状の液晶性化合物を用いて、血球系の腫瘍細胞である慢性骨髄性白血病細胞株 K562 の増殖を抑制できるリード化合物を得ることを目的として、K562 細胞株の増殖に及ぼす影響及びそのメカニズムを調べ、K562 細胞増殖抑制作用において重要と考えられる分子構造について検討を行った。

§ 2. 実験

2.1. 液晶性化合物

表 2-1 に示した 16 種類の液晶性化合物の構造を用いて薬理活性評価を行った。表 2-1 を再度示す。各化合物は DMSO に溶解し培地に添加した。

表 2-1 薬理活性評価に用いた液晶性化合物の分子構造

Compound d	Molecular structure	Compound d	Molecular structure
1		10	
2		11	
3		12	
4		13	
5		14	
6		15	
7		16	
9		17	

2.2 K562 細胞株培養方法

液晶性化合物の薬理活性を評価するために、慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を使用した。K562 は理研 Bio-Resource Center から購入した。また、培養は、1% ペニシリンストレプトマイシンを含むコーン改変ハム培地 F-12 (GIBCO® Invitrogen) 混液に、培地中 10%とした非働化ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum: FBS)を混合した液体培地にて行った。

2.3. 細胞増殖抑制作用評価方法

2.3.1 細胞培養方法

各液晶性化合物の K562 細胞増殖に対する作用を調べるために、棒状液晶化合物を Dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解させ、ろ過滅菌した 10 mM DMSO 溶液を調整した。培地に添加後の最終濃度は 10 μ M とした。培地に 5×10^4 cells/ml となるように細胞を播種し、24-well multi well plate (Sumitomo bakelite CO., Ltd, Tokyo, Japan) に 500 μ l/well ずつ入れて 2-3 日間培養した。比較のために DMSO のみを培地に加えたものをコントロールとした。

2.3.2 細胞計数方法

培養後、細胞を回収し、10 倍に希釈して、ZTM Series Particle counter (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA)を用いて細胞数を解析し、液晶性化合物を添加していないコントロールと比較した。50% Inhibitory concentration (IC₅₀)を算出する際には、死細胞をより明確に判別するために、トリパンプルーで細胞を染色し、算定盤上に播いて、生細胞数のみを計数した。死細胞は細胞の形状を保持できなくなったり、細胞膜に穴ができてしまうため、容易にトリパンプルーで染色することが可能であり、生細胞と判別することができる。

2.4. 細胞周期測定方法

細胞は分裂するために、細胞周期の進行に伴い DNA を合成し、量を増やしていく。細胞周期測定は、細胞周期の進行過程において各細胞周期の DNA 含有量が異なることを利用し、Sub G1 期、G1 期、S 期、G2/M 期という 4 つの各周期における細胞集積率を調べることである。そのためには、DNA 二重らせんに結合できる蛍光色素、Propidium iodide(PI, Sigma)で細胞を染色する。蛍光強度と DNA 量は比例するため、蛍光強度を測定することによって、全細胞数に対する、各細胞周期の細胞集積率が分かる。また、細胞周期測定結果は、図 2-2 に示すような横軸を PI 含有量(=DNA 量)、縦軸を細胞集積率としたヒストグラムで示される。

K562 細胞を ϕ 35mm dish(Falcon)で 24 時間および 48 時間培養したのち、回収し、あらかじめ氷冷しておいた Phosphate buffered saline (PBS)で細胞を洗った。その後、0.1% TritonX-100 を含む PBS 中に入れ、氷上で 5 分反応させたのち、50 μ g/ml PI を添加し、暗冷所で 60 分放置し細胞を染色した。PI で染色後は、Cell Lab Quanta SCTM MPL (Beckman-Coulter, California, USA)を用いて解析した。

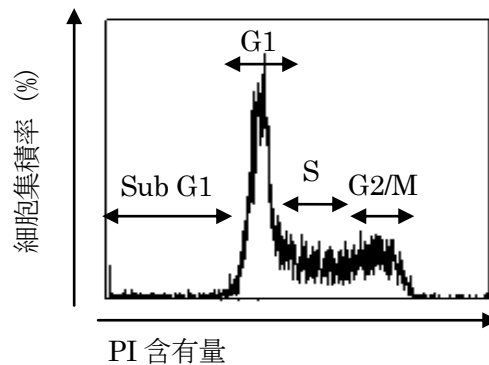


図 2-2 細胞周期測定結果を示すヒストグラム

2.5. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングでは、まず電気泳動により、ゲル上で目的とする特定のタンパク質を分離したのち、得られたタンパク質をセルロース膜に転写する。その後、抗原抗体反応により、セルロース膜上のタンパク質を検出する。サンプルで処理した細胞と処理していない細胞との全含有タンパク質の量が同等でなければ、発現タンパク量を比較することができない。そのため、サンプルで処理した細胞と処理していない細胞とに含まれるタンパク質の量が同等であることの指標に、細胞質内に含まれるアクチンを検出する。アクチンを使用するのは、その発現量が細胞内発現タンパク質に影響を受けにくく一定に保持されていると考えられるためである。本実験で使用した lysis buffer は 50 mM HEPES-HCl (pH 7.4)、100 mM NaCl、1% TritonX-100、そして 1 mM PMSF (Wako)を用いて予め調製しておいた。ウェスタンブロッティングは以下の方法に従って行った[12]。まずφ100mm dish で 24 時間サンプルを添加した培地で培養し、必要な細胞数を用意した。その後、氷冷した PBS を加えて洗浄し、得たペレットを lysis buffer によく懸濁したのち、氷上で 30 分放置した。次に氷上の温度に保ったまま超音波破碎(1 min ×2 回)し細胞を粉々にした。その後、15000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清に浮遊するタンパク質を回収し、Smart Spec™ Plus (Bio-Rad Lab, Hercules, California, USA)を用い、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad)でタンパク質濃度を決定し、すべての濃度が一定になるように lysis buffer で希釈し調製した。

今回、発現を調べたのは、生存に関与する Erk1/2 及び Erk1/2 がリン酸化された phospho-Erk1/2、細胞がストレスを感じた時に応答する p38 と phospho-p38、および JNK と phospho-JNK、そして、アポトーシスの活性を阻害する Bcl-xL の 7 つである。Bcl-xL はミトコンドリア外壁に存在している。

2.6. Caspase-3 活性化評価方法

Caspase-3 はアポトーシス実行タンパク質とも呼ばれ、アポトーシス誘導シグナル伝達経路の下流に存在する。実験には fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis kit I® (BD Biosciences, San Jose, California, USA)を用いた。Caspase-3 を検出するには、FITC で標識された caspase-3 の抗体を結合させ、蛍光を検出する。サンプルを添加した培地で 24 時間培養したのち、細胞を回収し氷冷した PBS で二回洗浄した。それから、細胞を Cytofix/Cytoperm™ solution に懸濁し、氷上に 20 分間放置した。その後、遠心して、Cytofix/Cytoperm™ solution を捨てたのち、ペレットを室温の Perm/Wash™ Buffer で二回洗浄した。細胞を Perm/Wash™ Buffer と rabbit anti-active caspase 3 antibody の混液に加え、室温で 30 分間インキュベートし、Perm/Wash™ Buffer で洗浄したのち、Perm/Wash™ Buffer に加え、Cell Lab Quanta™ SC MPL (Beckman-Coulter)を使って解析した。

Caspase-3 の検出結果は図 2-3 に示すようなヒストグラムで表示される。横軸は、蛍光強度で、縦軸は検出量である。蛍光が検出されないときは、左側に現れるピークのみが表示されるが、Caspase-3 が結合した FITC が検出されると、赤線に示すように右側にもピークが現れる。

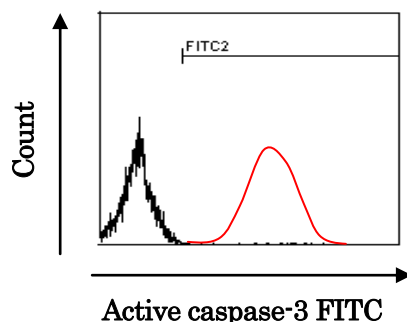


図 2-3 Caspase-3 の検出を示すヒストグラ

2.7. 統計処理

得られた結果がコントロールに対して差があるかどうかを判断するために、データ解析ソフト Origin を用いて有意差検定を行った。本実験では、危険率を 5%とし、Mann-Whitney の U 検定および Student の t 検定で行った。

§ 3. 結果と考察

3.1. K562 細胞増殖抑制作用

3.1.1 液晶性化合物による細胞増殖抑制作用

慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を用いて、分子末端にヒドロキシ基を有する棒状液晶性化合物 (表 1-1) のうち 8 と 18 を除く 16 種類について K562 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。表 1-1 に示した化合物は、ベンゼン環、ピリミジン環、ピリジン環あるいは縮合環をコア構造として持っている。液晶性化合物を添加せずに培養して得られた細胞数を 1 として、それに対する細胞生存率を求めた。液晶性化合物はあらかじめ DMSO に溶解させておき、それを培地に添加し、最終濃度が 10 μM となるようにした。結果を図 2-4 および表 2-1 に示す。図 2-4 にみられる * 印は、統計処理を行い、コントロールの細胞数に対して、液晶性化合物を添加した際の細胞数に有意な差があると認められたものである。また、表 2-1 には、細胞増殖抑制率を示した。

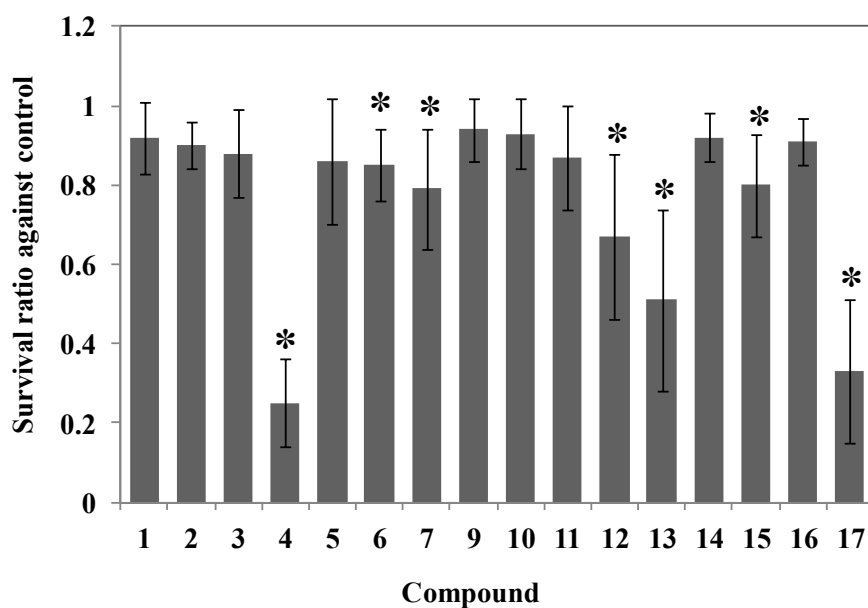


図 2-4 棒状液晶化合物を培地中 10 μM となるように添加したときの K562 細胞増殖に及ぼす影響

表 2-2 棒状液晶性化合物を培地中 10 μM となるように添加したときの K562 細胞のコントロールに対する細胞増殖抑制率

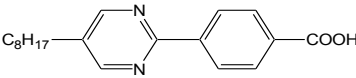
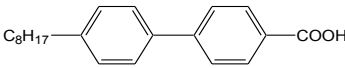
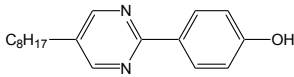
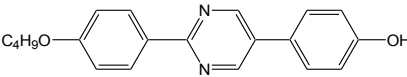
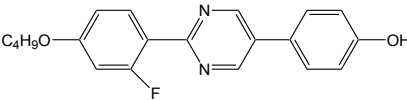
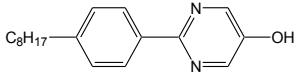
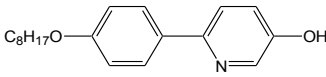
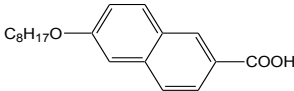
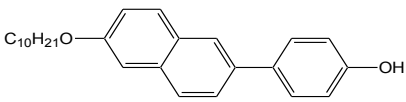
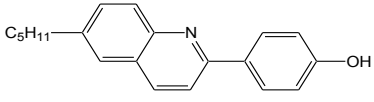
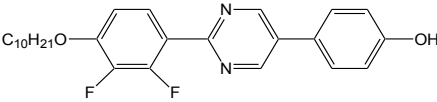
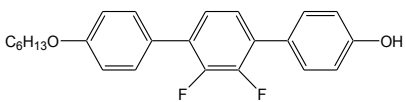
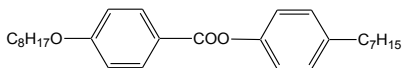
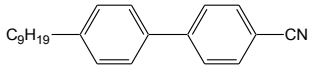
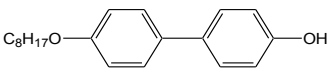
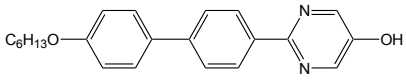
Compound	Molecular structure	Suppressive activity
1		8%
2		10%
3		12%
4		75%
5		14%
6		15%
7		21%
9		6%

表 2-2 棒状液晶性化合物を培地中 10 μM となるように添加したときの K562 細胞のコントロールに対する細胞増殖抑制率

Compound	Molecular structure	Suppressive activity
10		7 %
11		13 %
12		33 %
13		49 %
14		8 %
15		20%
16		9 %
17		67%

K562 の細胞増殖を最も抑制したのは 4 で、液晶性化合物を添加していないコントロールに対して、75%の細胞増殖抑制作用を示した。4 に続いて、強い細胞増殖抑制作用を示したのは 13 と 17 で、その抑制率はそれぞれ 49%および 67%であった。強力な細胞増殖抑制作用を示した 4 と 17 の構造は、コア部分に 1 つのピリミジン環を含む 3 つの芳香環を有しており、10 は側方置換基として二つのフッ素を含む 3 つの芳香環を有していた。さらにこれらは分子末端にヒドロキシル基をもっていた。

三つの芳香環を有する化合物 4、12、13、そして 17 は、二つの芳香環を有する化合物 1-3、6、7、そして 16 に比べ、高い抑制作用を示す傾向が見られた。縮合した構造で抑制作用がみられないものの、芳香環を 3 つ含むような剛直なコア構造で抑制作用がみられており、抑制作用とコア構造との関連が示唆される。また、化合物 4 にフッ素が置換した 5 では、抑制作用が消失した。フッ素は高い電気陰性度を有し、小さな原子サイズであることから興味深い特性を有している。本研究ではフッ素を含むことで抑制作用が消失したが、フッ素が、分子構造や抑制作用にどのような影響を及ぼしたかは不明である。

3.1.2 細胞抑制作用の濃度依存性

培地中のサンプル濃度 10 μM で顕著な細胞増殖抑制作用を示した 4 と 17 について、培地中のサンプル濃度を変化させて、24 時間培養したときの細胞増殖抑制率を調べた。サンプル濃度を 1 μM 、5 μM 、10 μM 、30 μM 、50 μM としたときの生細胞数をプロットした。図 2-5 に示した結果より、30 μM で、7 と 9 はいずれも K562 細胞をほぼ死滅させた。4 と 17 の細胞増殖抑制率は濃度に依存して高くなることが分かった。そして、4 と 17 の IC_{50} 値はそれぞれ 7.2 μM および 9 μM となった。4 と 17 の細胞増殖抑制作用の濃度依存性に大きな差異は見られなかった。

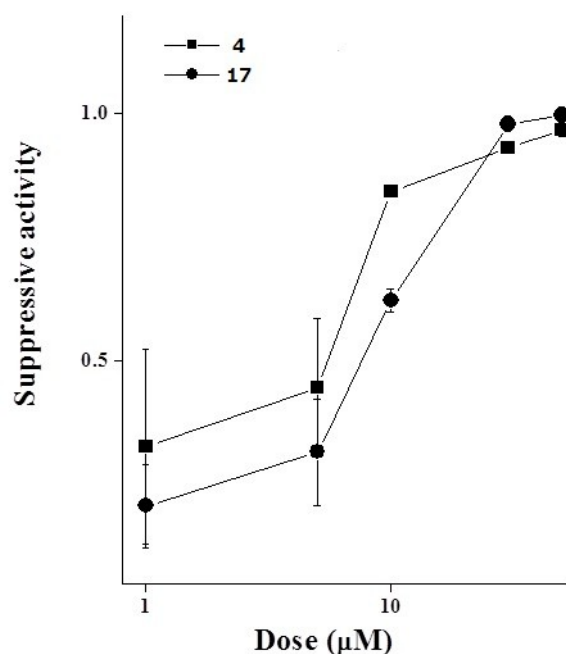


図 2-5 化合物 4 と 17 の細胞増殖抑制作用の濃度依存性

3.1.3 細胞抑制作用の時間依存性

細胞増殖抑制率が最も高かった4のIC₅₀値が7.2 μMであったことから、7 μMを基準として、7 μMおよび14 μMの時の4と17の細胞増殖抑制作用の時間依存性について調べた。結果を図2-6に示す。4と17はそれぞれ抑制効果が異なるものの、いずれも時間依存的に細胞増殖を抑制していることが分かった。さらに、ここで得られた結果と、前述の結果である4が17よりも強い細胞毒性を示すことには整合性がある。また、48時間後の4と17の抑制効果を比べると、経過時間と死滅する細胞数とに相関がある。また、時間が経過しても、抑制効果の順位は変動しないとわかった。

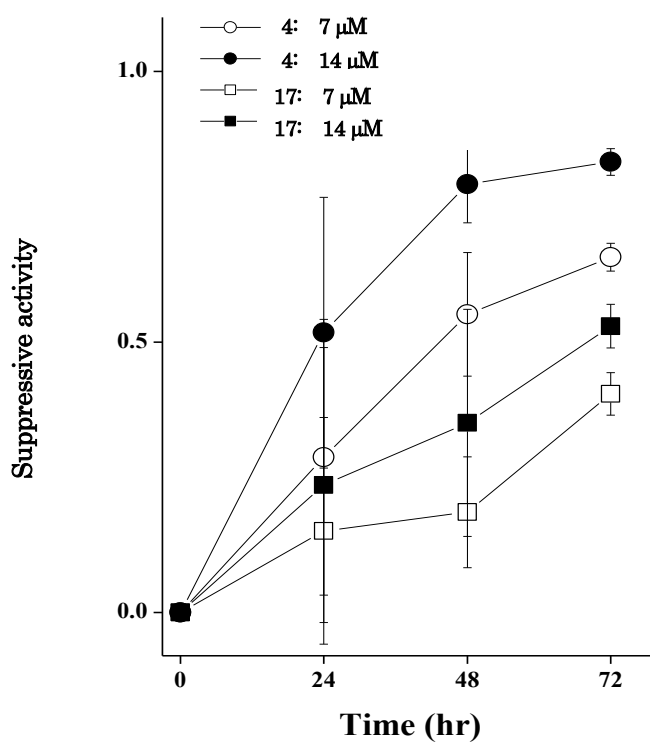


図2-6 細胞増殖抑制作用の時間依存性

3.2 細胞周期測定結果

これまでの結果から、4 と 17 が K562 細胞の増殖を抑制する作用には濃度依存性及び時間依存性があると分かった。4 や 17 が細胞増殖を抑制していることから、細胞増殖のために必要不可欠な DNA 合成を行う細胞周期の進行を妨げていることが示唆される。そのため、4 と 17 に関して細胞周期測定を行った。細胞周期測定は、濃度 7 μ M および 14 μ M で行った。細胞周期測定を行うにあたり、死細胞のみを評価してはサンプルが細胞周期のどの段階で作用したのかわ明らかにできない。また、サンプルが作用してから細胞が死滅するまでに要する時間を考慮すると、サンプルの及ぼす影響を評価するのに適当な時間は、48 時間以前となる。そこで、サンプルを添加後 24 時間後および 48 時間後に回収し調べた。

図 2-7 には、4 と 17 の細胞周期に及ぼす影響をヒストグラムで示す。また、図 2-8 には、4 の及ぼす顕著な Sub G1 期の細胞集積率に注目した濃度依存性をグラフとして示した。Sub G1 期には、DNA 断片化により細胞周期より逸脱した細胞集団が集積する。DNA 断片化した細胞は死細胞と捉えられるが、アポトーシスであるかは、細胞周期測定からは明らかにできない。図 2-7 において、4 を 7 μ M 添加した際には、24 時間後および 48 時間後において、Sub G1 期に顕著な集積がみられた。このとき G1 期および S 期では、コントロールに対して、より多くの集積がみられないことから、細胞の増殖過程は、G1 チェックポイントを通過できたと考えられる。また、G2/M 期の細胞に集積がみられる。これらのことから、4 は S 期以降の細胞に作用したと考えられる。さらに、4 が 14 μ M の場合には、7 μ M のときに比べて、Sub G1 期により多くの集積が確認できた。一方、17 が 7 μ M のときについては、24 時間後に、G1 期の細胞集団がわずかに増加したものの、コントロールに対して差は認められなかった。さらに 4 は 17 と異なり、Sub G1 期の集積はみられなかった。つまり、細胞周期の進行を遅らせているのみで、細胞死を誘導しているものではないと考えられる。また、48 時間後には、S 期および G2/M 期の細胞集団の減少がみられ、このことは、17 が G1 期に作用し、細胞周期の進行を妨げていることを示唆する。17 は、14 μ M のときも 7 μ M と同様の分布を示し、24 時間後、48 時間後のいずれの場合においても差はみられなかった。以上のことより、4 は、細胞死を誘導できたが、17 は、細胞死を誘導しないことがわかった。

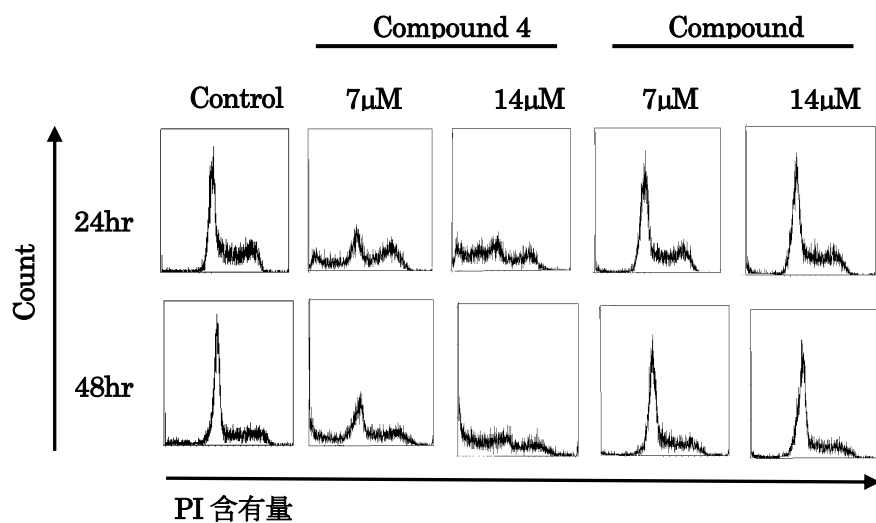


図 2-7 細胞周期測定結果

4 について、7 μ M、14 μ M のときの Sub G1 期における細胞集団の集積率をグラフにまとめた(図 2-8)。有意差検定を行ったところ、コントロールに対して 14 μ M のときに差が認められた。よって、4 が K562 に対して及ぼす影響は、細胞内核 DNA の断片化を引き起こし、細胞死をもたらすものであるとわかった。

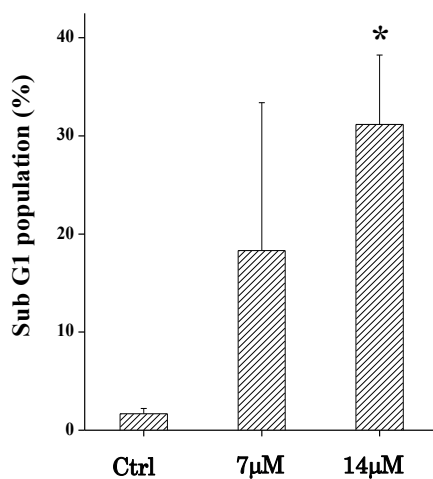


図 2-8 4 の抑制作用による Sub G1 期の細胞集積率の濃度依存性

3.3 細胞内情報伝達関連タンパク質の解析

4 が K562 細胞に誘導した細胞死について、その誘導メカニズムを知るために、ウエスタンブロッティングによって細胞内情報伝達関連タンパク質の活性化を調べた。生存に関与するタンパク質である Erk および Bcl-xL、そして細胞が外部からストレスを感じたときに応答する p38 および JNK についてその発現量を定性的に調べた。その結果を図 2-9 に示す。活性化したタンパク質には、リン酸化されたことを示すため Phos- という頭文字を付けた。まず生存シグナルに関わる Erk と Bcl-xL についての結果をまとめる。Erk の発現量に関しては、コントロールと 4 の間に差は見られなかった。コントロールでは時間が経つにつれて、Phos-Erk の発現量は増加しているが 4 ではコントロールより増加量が少ない。また、Bcl-xL の発現量に関して、コントロールでは時間が経っても発現量が増えているが、4 は発現量が減少している。これらのことから、細胞内で生存シグナルが弱まっていることがわかった。次に、細胞外からのストレスに応答する p38 と JNK についての結果を述べる。細胞外からのストレスとは、高浸透圧や熱ショックなどの細胞が受けるダメージのことで、細胞がストレスを受ければ、p38 や JNK は活性化される。コントロールの p38 と phos-p38 はほとんど差がみられなかったのに対して、7 では、Phos-p38 の発現量が時間経過に伴い徐々に増加した。また、コントロールの Phos-JNK はほとんど発現せず、ストレスを感じていないのに対して、4 の JNK は 24 時間後までに徐々に減少し、Phos-JNK は 24 時間後に顕著に発現量が増加した。これらのことから、4 の影響によって、細胞がストレスを受けていることが分かった。Phos-p38 と Phos-JNK の発現量が増加していたこと、3.2 節で述べたように、細胞周期を調べたところ、DNA 断片化が引き起こされていたことから、4 が誘導した細胞死はストレスによるアポトーシスである可能性が考えられる。ここまでで分かったシグナル伝達を、図 2-9 にまとめた。アポトーシスが誘起されているならば、caspase-3 も活性化されていなければならない。次に caspase-3 の発現について調べた。

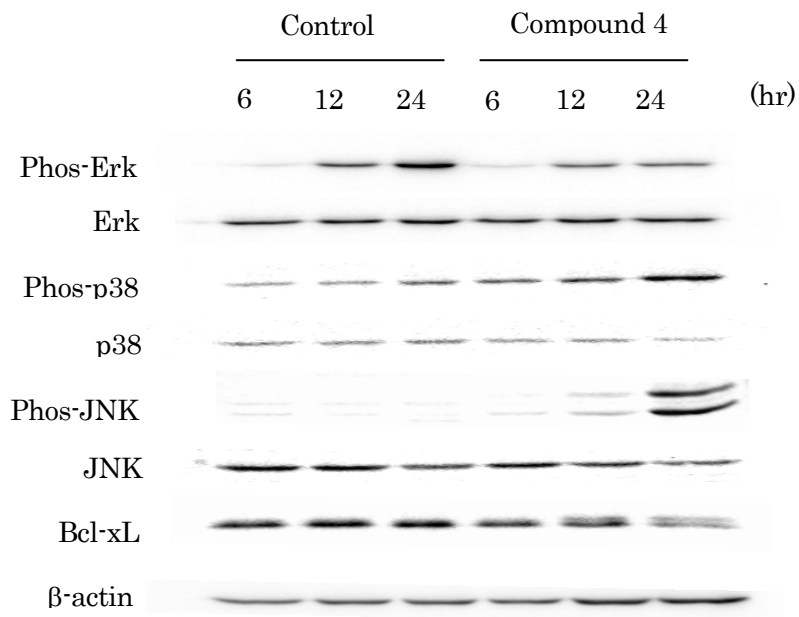


図 2-9 細胞増殖およびアポトーシスに関連するタンパク質の定性的発現量

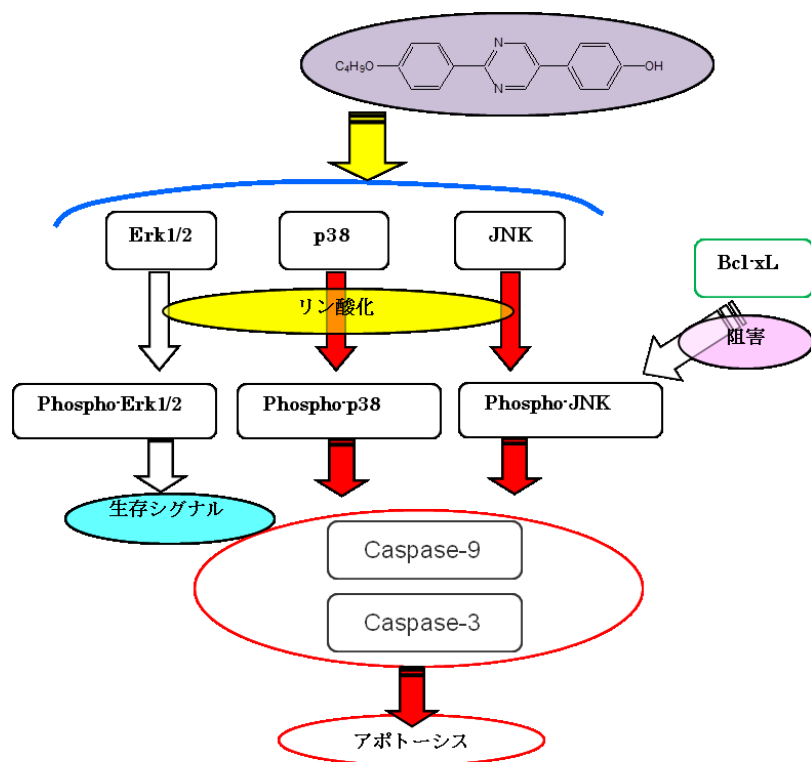


図 2-10 4 が誘起したと考えられるタンパク質とそれらのシグナル伝達経路

3.4 Caspase-3 活性化によるアポトーシス誘導

ウエスタンブロッティングの結果から、4 はストレスによる細胞死を誘起し、それがアポトーシスであると示唆された。アポトーシスを誘導できているとすれば、細胞内シグナル伝達経路上で、JNK よりも下流に存在する caspase-3 が活性化されている必要がある。そのため、caspase-3 の検出を行い、活性化されているか調べた。結果を図 2-11 に示す。ヒストグラムの縦軸は細胞数で、横軸は蛍光強度を示す。Caspase-3 を検出するための抗体に蛍光色素が結合しているため、caspase-3 の検出は、蛍光強度が高まることで分かる。ヒストグラム右側の蓄積が、caspase-3 が活性化している細胞である。24 時間培養後、7 μ M ではコントロールに対して 4 倍、14 μ M では 7 倍 caspase-3 の活性化が観察された。48 時間後についても、7 μ M では 3 倍、14 μ M では 7 倍と、24 時間後とほぼ同程度の caspase-3 の活性化が示された。このように caspase-3 が活性化していたことから、4 は K562 細胞に対してアポトーシスを誘導できることが明らかとなった。

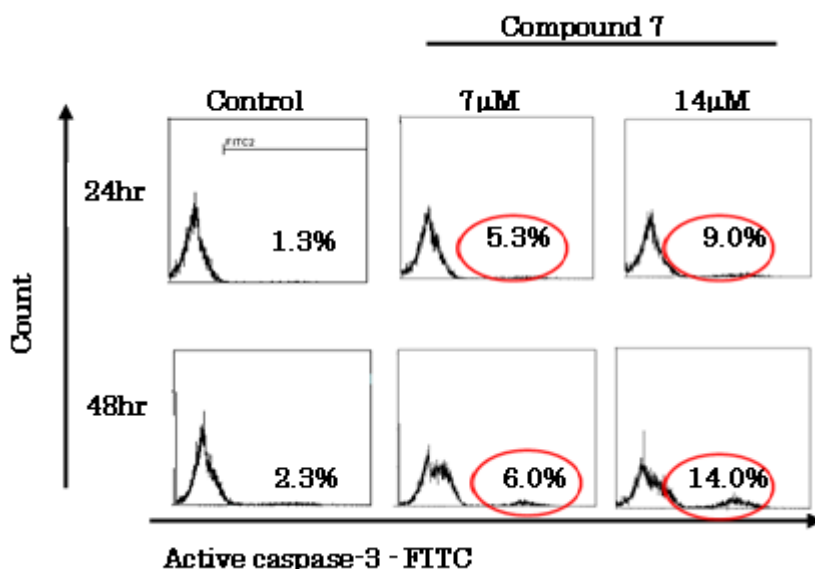
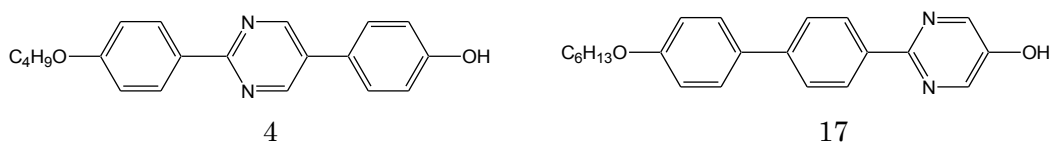


図 2-11 Caspase-3 が活性化した細胞数の割合

§ 4. 結言

16 種類の液晶関連化合物の **K562** に及ぼす影響を評価したところ、以下に分子構造を示す化合物 **4** と **17** が、 $10\ \mu\text{M}$ で顕著な細胞増殖抑制作用を示すことが分かった。コア部分に一つのピリミジン環を含む 3 つの芳香環をもち、分子末端にヒドロキシル基をもつ構造が、**K562** 抑制作用を誘起した。



細胞増殖抑制メカニズムを調べたところ、**4** は **K562** に対して DNA 断片化を伴うアポトーシスを誘導し、**17** は細胞増殖を抑制したものの細胞死を誘導しなかった。**4** のアポトーシス誘起は、細胞外ストレス応答タンパク質である **p38**、**JNK** の活性化と生存シグナルに関連するタンパク質 **Erk** の減少を伴い、アポトーシス実行タンパク質 **caspase-3** の活性化が認められた。

本研究において、棒状液晶性化合物のスクリーニングおよび細胞増殖抑制メカニズムを調べることによって、今後、白血病治療における薬剤の分子設計に重要なリード化合物を得ることができた。

§ 5. 参考文献

- 1 Z Peng, L Lan, F Zhao, J LI, Q Tan, H Yin, H Zeng, *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, **9**, 16 (2008).
- 2 H Uga, C Kuramori, A Ohta, Y Tsuboi, H Tanaka, M Hatakeyama, Y Yamaguchi, T Takahashi, M Kizaki, H Hanada, *Pharm. Res.*, **26**, 338 (2008).
- 3 M Hazawa, K Wada, K Takahashi, T Mori, N Kawahara, I Kashiwakura, *Invest. New Drugs* **27**, 111(2009).
- 4 L Martelli, E Ragazzi, F Di Mario, M Basato, M Martelli, *Anticancer Res.*, **29**, 3931 (2009).
- 5 S Wang, G Weiner, *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**,: 759 (2008)
- 6 A Skobridis, M Kinigopoulou, V Theodorou, E Giannousi, A Russell, R Chauhan, R Sala , N Brownlow, S Kiriakdis, J Domin, A Tzakos, N Dibb, **5**, 130 (2010)
- 7 BJ Druker, CL Sawyers, H Kantarjian, *N Engl. J. Med.*, **344**,1038 (2001)
- 8 BJ Druker, S Tamura, E Buchdunger, S Ohno, G Segal, S Fanning, J Zimmermann, N Lydon, *Nature Med.*, **2**, 561 (1996)
- 9 C Stevenson, D Bennett, D Lechuga-Ballesteros, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1861 (2005)
- 10 A Yoshizawa, Y Takahashi, R Terasawa, S Chiba, K Takahashi, M Hazawa I Kashiwakura, *Chem. Lett.*, **38**, 310 (2009)

第三章 末端ヒドロキシル基を有する液晶性フェニルベンゾエート誘導体の合成と抗腫瘍効果

§ 1. 緒言

日本人の死亡原因で最も多いものとして癌が挙げられるが、その癌の中でも一番死亡率の高いものが肺癌である。この肺癌は、治療上、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に大別でき、状況に応じて外科手術や化学療法を組み合わせる治療が施される。現在、癌化学療法においては、殺細胞効果の高いドキソルビシンやシスプラチン、また分子標的薬であるゲフィチニブが治療に使用されている。ドキソルビシンやシスプラチンは、癌細胞に対して強力な殺細胞効果を有しているものの、正常な細胞にまで影響を及ぼすことが問題点の一つとなっている。また、分子標的薬は、非小細胞肺癌に対しては、2章で述べた白血病よりも効果が低く、癌細胞が耐性をもった場合にのみ使用できることから、薬剤の使用に制限がある。そのため、さらなる薬剤開発及び探索が続けられている。

肺癌などの固形腫瘍は、増殖する過程で必要な栄養分を十分に得るために血管新生を行うが、このような新しくできた血管は不完全でランダムに癌細胞を覆うため、薬剤が癌細胞へ到達することを妨げる。ドキソルビシンでは、癌細胞に対する低浸透性及び低分散性が報告されている[1]。このような問題点を解決するために、ドキソルビシンなどの薬剤を内包して癌細胞への取り込みを促進するドラッグデリバリーシステムが提案されている。また、ドラッグデリバリーシステムは薬剤を内包するキャリアを伴うものばかりでなく、薬剤であるドキソルビシンに高分子を結合させたもの[2]、自発的にミセル[3]やリポソーム[4]、ナノゲル[5]状態を形成できるもの、デンドリマー型[6]、ナノ粒子を形成するもの[7]とさまざまな形態がある。

一方、生体構造の中で、細胞膜はリン脂質からなるラメラ構造を有する液晶状態であることから、液晶性化合物に細胞膜との親和性があると考えられ、液晶性を有する薬剤の細胞膜への取り込みの促進が期待される。これまでに、吉澤、高橋らによって、非小細胞肺癌細胞株 A549 に対する液晶性化合物の抗腫瘍効果が報告されており、分子末端にヒドロキシル基を有するシアノビフェニル誘導体が A549 細胞の増殖を抑制することが分かっている[7, 8]。また、これらのシアノビフェニル誘導体は、DMSO/水系において、メトキシビフェニル誘導体と混合することで集合体を形成し、各単体よりも高い抑制率を示した[8]。しかしながら、報告されているシアノビフェニル誘導体の増殖抑制作用は細胞周期の停止を引き起こしたことに起因するもので、A549 細胞に細胞死を誘導することは出来ていない。

そこで本研究では、細胞死を誘導し、集合体形成能を有する棒状液晶分子を得ることを目的として、分子末端にヒドロキシル基を有するフェニルベンゾエート誘導体を合成し、それらの A549 細胞に対する抗腫瘍効果および集合体形成能を調べた。

§ 2. 実験

2.1. 材料

合成に用いた試薬および溶媒は市販のものを精製せずに用いた。

2.1.1 精製および純度測定

目的化合物は、ジクロロメタン/酢酸エチル混合溶媒を展開溶媒としたカラムクロマトグラフィーにより精製した。その固定相にはシリカゲル(63-210 μm , Kanto Chemical Co., Inc.)を用いた。カラムクロマトグラフィーによる精製のあと、さらにエタノールで再結晶を行った。化合物の検出は UV 照射($\lambda=254$ and 365 nm)により行った。また、純度の確認は薄層クロマトグラフィー(TLC, aluminium sheets, silica gel 60 F254, Merk)及び元素分析(EA 1110; CE Instruments Ltd.)により行った。

2.1.2 機器分析

目的化合物の構造確認は ^1H NMR (JMN-ECA500; LEOL)及び IR スペクトル(Varian 670-IR; Varian Inc.)により行った。

IR データは以下の略記を用いる。

str. stretching

^1H NMR データは以下の略記を用いる。

s. singlet

d. doublet

dd. double doublet

t. triplet

qa. quartet

qi. quintet

m. multiplet

NMR および IR を用いた生成物の構造解析によって、目的とした構造と一致することを確認した。

2.1.3 フェニルベンゾエート誘導体の合成

2.1.3.1 Ethyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)phenyl benzoate (19)

Ethyl 4-hydroxybenzoate (18 mmol, 3.0 g) をシクロヘキサノン 15 ml に溶解させ、次に 6-bromo-1-hexanol (21.6 mmol, 3.9 g) と K_2CO_3 (7.5 mmol, 1.0 g) を加え、110°C で 6 時間攪拌した。6 時間攪拌後、 K_2CO_3 を 1.2 g 足し、さらに 4 時間攪拌し、反応を終了した。 K_2CO_3 をろ過により除去したのち、減圧濃縮し、48 時間放置した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(10/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、ヘキサンで再結晶し、目的物を得た。Yield=3.4 g (70.9%)

1H NMR (500 MHz, solvent $CDCl_3$, standard TMS) δ 7.98 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 6.90 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 4.34 (qa, 2H, $-OCH_2CH_3$, $J=7.1$ Hz), 4.01 (t, 2H, $-OCH_2-$, $J=6.3$ Hz), 3.67 (t, 2H, $-CH_2-OH$, $J=6.3$ Hz), 1.82 (qi, 2H, $-OCH_2CH_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.61 (qi, 2H, $-CH_2CH_2-OH$, $J=7.0$ Hz), 1.54–1.43 (m, 4H, aliphatic $-CH_2-$), 1.38 (t, 3H, $-CH_3$, $J=7.2$ Hz), 1.29 (br s, 1H, $-OH$). ν/cm^{-1} (KBr): 3295 (O-H str.), 2946, 2876 (C-H str.), 1709 (C=O str.), 1605 (C=C str.), 1173 (C-O str.). Elemental analysis. Calculated for $C_{15}H_{22}O_4$: C, 67.64; H, 8.330; O, 24.03. Found: C, 66.61; H, 7.55.

2.1.3.2 4-(6-Hydroxyhexyloxy)benzoic acid (20)

Ethyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)phenyl benzoate (530 mg, 2.0 mmol) を、EtOH/ H_2O (19/1) 混合溶媒 20 ml に溶解させ、KOH (340 mg, 6.1 mmol) を加え、還流させながら 90°C で 4 時間攪拌した。次に、 H_2O 40 ml を加え、塩酸性条件下(pH < 1)とし、ジクロロメタン(20 ml \times 7)で抽出し、その有機層を硫酸ナトリウムで脱水し乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別しその濾液を濃縮し、白色固体の目的物を得た。Yield=340 mg (71.3%)

1H NMR (500 MHz, solvent $CDCl_3$, standard TMS) δ 7.84 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 6.97 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 4.00 (t, 2H, $-OCH_2-$, $J=6.6$ Hz), 1.69 (qi, 2H, $-OCH_2CH_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.43–1.29 (m, 6H, aliphatic $-CH_2-$). ν/cm^{-1} (KBr): 3429 (O-H str.), 2924, 2853 (C-H str.), 1724 (C=O str.), 1606 (C=C str.), 1171 (C-O str.). Elemental analysis. Calculated for $C_{13}H_{18}O_4$: C, 65.53; H, 7.61; O, 26.86. Found: C, 63.77; H, 7.01.

2.1.3.3 4-(4-Cyanophenyl)phenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (21)

4-Hydroxy-4'-cyanobiphenyl (195 mg, 1 mmol) と 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (239 mg, 1 mmol) をジクロロメタン 15 ml 中に入れた。次に DCC (206 mg, 1 mmol) と DMAP (20 mg, 0.16 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶し、目的物を得た。Yield=140 mg (33.7%)

^1H NMR (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.16 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 7.74 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 7.69 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 7.64 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 7.33 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 6.99 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 4.07 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$, $J=6.3$ Hz), 3.68 (qa, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=5.5$ Hz), 1.86 (qi, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=6.9$ Hz), 1.63 (qi, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=7.0$ Hz), 1.57-1.44 (m, 4H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.26 (br t, 1H, $-\text{OH}$, $J=5.5$ Hz). ν/cm^{-1} (KBr): 3487 (O-H str.), 2935, 2879 (C-H str.), 1727 (C=O str.), 1604 (C=C str.), 1165 (C-O str.). Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_4$: C, 75.16; H, 6.06; N, 3.37; O, 15.40. Found: C, 74.56; H, 6.26; N, 3.33.

2.1.3.4 4-(5-Octylpyrimidine-2-yl)phenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (22)

2-(4-hydroxyphenyl)-5-octylpyrimidine (285 mg, 1 mmol)をジクロロメタン 3 ml に溶解させたのち、4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (238 mg, 1 mmol)とジクロロメタン 5ml を加えた。次に、DCC (213 mg, 1 mmol)と DMAP (65 mg, 0.5 mmol)を加え、ジクロロメタン 5 ml を加えた。常温で 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(5/3)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶し、目的物を得た。Yield=280 mg (55.5%)

^1H NMR (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.62 (s, 2H, Ar-H), 8.49 (d, 2H, Ar-H, $J=8.7$ Hz), 8.16 (d, 2H, Ar-H, $J=8.7$), 7.33 (d, 2H, Ar-H, $J=8.9$ Hz), 6.98 (d, 2H, Ar-H, $J=8.8$ Hz), 4.06 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 3.68 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=6.4$ Hz), 2.63 (t, 2H, Ar- CH_2- , $J=7.7$ Hz), 1.85 (qi, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=6.9$ Hz), 1.69-1.32 (m, 14H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=6.9$ Hz). ν/cm^{-1} (KBr): 3434 (O-H str.), 2927, 2854 (C-H str.), 1732 (C=O str.), 1606 (C=C str.), 1258, 1165 (C-O str.). Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 73.78; H, 7.99; N, 5.55. Found: C, 73.87; H, 7.66; N, 5.60.

2.1.3.5 4-Cyanophenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (23)

4-Cyanophenol (145 mg, 1.2 mmol)、4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (286 mg, 1.2 mmol)、DCC (270 mg, 1.3 mmol)と DMAP (36 mg, 0.3 mmol)を、ジクロロメタン 12 ml 中に加え、室温で一晩攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(5/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで 2 回再結晶を行い、目的物を得た。Yield=240 mg (59.0%)

^1H NMR (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.12 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$), 7.73 (d, 2H, Ar-H, $J=8.8$ Hz), 7.35 (d, 2H, Ar-H, $J=8.8$), 6.98 (d, 2H, Ar-H, $J=9.1$ Hz), 4.06 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$, $J=6.5$ Hz), 3.68 (qa, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=5.4$ Hz), 1.85 (qi, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.63 (qi, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=7.0$ Hz), 1.56-1.45 (m, 4H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.24 (br t, 1H, $-\text{OH}$).

ν/cm^{-1} (KBr): 3487 (O-H str.), 2935, 2879 (C-H str.), 1727 (C = O str.), 1604 (C = Cstr.), 1165 (C-O str.), Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C, 70.78; H, 6.24; N, 4.13; O, 18.86. Found: C, 70.87; H, 6.11; N, 4.11.

2.1.3.6 4-Butylphenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (24)

4-(6-Hydroxyhexyloxy)benzoic acid (242 mg, 1 mmol)をジクロロメタン 7 ml 中に入れ、次に 4-butylphenol (154 mg, 1 mmol)を滴下した。その後、DCC (210 mg, 1 mmol)と DMAP (24 mg, 0.2 mmol)を加え、ジクロロメタン 5 ml を追加し、室温で一 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル (10/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶を行い、目的物を得た。Yield=150 mg (40.5%)

^1H NMR (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.14 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 7.22 (d, 2H, Ar-H, $J=8.0$), 7.10 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 6.97 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 4.06 (t, 2H, $-\text{OCH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 3.68 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=6.6$ Hz), 2.63 (t, 2H, Ar- CH_2- , $J=7.7$ Hz), 1.85 (qi, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.66-1.45 (m, 8H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.38 (sext, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J=7.5$ Hz), 1.28 (br s, 1H, $-\text{OH}$), 0.94 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=7.2$ Hz). ν/cm^{-1} (KBr): 3360 (O-H str.), 2933, 2857 (C-H str.), 1725 (C = O str.), 1607, 1514 (C = Cstr.). Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_8$: C, 74.56; H, 8.16. Found: C, 74.41; H, 8.05.

2.1.3.7 3-Pentyloxyphenyl 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (25)

Resorcinol (330 mg, 3 mmol)をシクロヘキサノール 3 ml に溶解させ、1-bromopentane (305 mg, 2 mmol)を滴下した。その後、シクロヘキサノール 3 ml を追加し、 K_2CO_3 (280 mg, 2 mmol)を加えた。最後にもう一度シクロヘキサノール 3 ml を追加し、70°C で 7 時間攪拌し、反応を終了した。 K_2CO_3 をろ過により取り除いたあと、減圧濃縮し、真空乾燥した後、一晩放置した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル (5/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、得られた目的物が液体であったため、ヘキサノール 5 ml を加え、1-bromopentane を分留した。ヘキサノールによる分留を 3 回行うことで、精製し、液体の 3-pentylphenol を得た。Yield=109 mg (30.2%)

3-Pentyloxyphenol (109 mg, 0.6 mmol)をジクロロメタン 4 ml 中に入れ、次に 4-(6-hydroxyhexyloxy)phenyl benzoic acid (143 mg, 0.6 mmol)を加えた。その後、DCC (140 mg, 0.7 mmol)と DMAP (15 mg, 0.1 mmol)を加え、ジクロロメタン 5 ml を追加し、室温で一 20 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル (5/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶を行い、目的物を得た。

Yield=75 mg (31.2%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.14 (d, 2H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 7.30 (d, 2H, Ar-H, $J=8.0$), 6.97 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 6.82–6.75 (m, 3H, Ar-H), 4.06 (t, 2H, $-\text{OOC-Ar-OCH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 3.96 (t, 2H, $-\text{OCO-Ar-OCH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 3.68 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-OH}$, $J=6.3$ Hz), 1.85 (qi, 2H, $-\text{OOC-Ar-OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.79 (qi, 2H, $-\text{OCO-Ar-OCH}_2\text{CH}_2-$, $J=7.0$ Hz), 1.63 (qi, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, $J=7.0$ Hz), 1.59–1.36 (m, 8H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.28 (br s, 1H, $-\text{OH}$), 0.93 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=7.2$ Hz). ν/cm^{-1} (KBr): 3425 (O-H str.), 2936, 2866 (C-H str.), 1724 (C=O str.), 1607, 1512 (C=C str.) 1256, 1163 (C-O str.). Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$: C, 71.97; H, 8.05; O, 19.97. Found: C, 72.04; H, 7.88.

2.1.3.8 4-Butylphenyl 3,4-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (26)

Ethyl 3,4-dihydroxy benzoate (275 mg, 1.5 mmol)をシクロヘキサノン 8 ml に溶解させ、6-bromo-1-hexanol (632 mg, 3.5 mmol)と K_2CO_3 (625 mg, 4.5 mmol)を入れ、シクロヘキサノン 5 ml を追加した。110 °C で 7 時間攪拌し反応を終了した。その後 K_2CO_3 を除去し、減圧濃縮、真空乾燥したのち、一晚放置した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒とし、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、ヘキサンで再結晶し、真空乾燥を行い ethyl 3,4-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate を得た。Yield=220 mg (38.3%)

次に Ethyl 3,4-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (210 mg, 0.55 mmol)を、EtOH/ H_2O (19/1)混合溶媒 20 ml に溶解させ、KOH (100 mg, 1.78 mmol)を加え、還流させながら 90°C で 5 時間攪拌した。次に、 H_2O 40 ml を加え、塩酸酸性条件下(pH< 1)とし、ジクロロメタン(50 ml \times 4)で抽出し、その有機層を硫酸ナトリウムで脱水し乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別しその濾液を濃縮、真空乾燥し、3,4-Bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid を得た。Yield=189 mg (97%)

3,4-Bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (178 mg, 0.5 mmol)をジクロロメタン 7 ml 中に入れ、DCC (153 mg, 0.74 mmol)と 4-Butylphenol (77 mg, 0.51 mmol)を加えた。その後、ジクロロメタン 5 ml を追加し、DMAP (16 mg, 0.13 mmol)を入れ、常温で 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮、真空乾燥を行い、白色固体の目的物を得た。Yield=112 mg (46%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 7.81 (dd, 1H, Ar-H, $J=8.1$ Hz), 7.66 (d, 1H, Ar-H, $J=2.3$ Hz), 7.21 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 7.10 (d, 2H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 6.92 (d, 1H, Ar-H, $J=8.6$ Hz), 4.08 (qi, 4H, Ar- OCH_2- , $J=6.7$), 3.66 (si, 4H, $-\text{CH}_2\text{-OH}$, $J=3.3$ Hz), 2.63 (t, 2H, Ar- CH_2- , $J=7.7$ Hz), 1.87 (si, 4H, Ar- $\text{OCH}_2\text{-CH}_2-$, $J=7.6$ Hz), 1.65–1.58 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 1.56–1.44 (m, 8H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.37 (si, 4H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2-$, $J=7.3$ Hz),

0.93 (t, 3H, -CH₃, 7.5). ν/cm^{-1} (KBr): 3529 (O-H str.), 2934, 2860 (C-H str.), 1725 (C = O str.), 1606, 1513 (C = Cstr.). Elemental analysis. Calculated for C₂₉H₄₂O₆: C, 71.57; H, 8.7. Found: C, 71.47; H, 8.60.

2.1.3.9 4-Butylphenyl 3,5-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (27)

Methyl 3,5-dihydroxy benzoate (509 mg, 3 mmol)をシクロヘキサノン 5 ml に溶解させ、6-bromo-1-hexanol (1100 mg, 6 mmol)とシクロヘキサノン 2 ml を加えた。次に K₂CO₃(565.7 mg, 4 mmol)を入れ、シクロヘキサノン 3 ml を追加した。120 °C で 8 時間攪拌し反応を終了した。その後 K₂CO₃を除去し、減圧濃縮、真空乾燥したのち、一晩放置した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒とし、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮と真空乾燥を行い、Methyl 3,5-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate を得た。Yield=470 mg (42.5%)

Methyl 3,4-bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoate (530 mg, 2.0 mmol)を、EtOH/H₂O (19/1)混合溶媒 20 ml に溶解させ、KOH (340 mg, 6.1 mmol)を加え、還流させながら 90°C で 4 時間攪拌した。次に、H₂O 40 ml を加え、塩酸酸性条件下(pH < 1)とし、ジクロロメタン(20 ml × 7)で抽出し、その有機層を硫酸ナトリウムで脱水し乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別しその濾液を濃縮し、白色固体の 3,5-Bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid を得た。Yield=340 mg (71.3%)

3,5-Bis(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (178 mg, 0.5 mmol)をジクロロメタン 7 ml 中に入れ、次に DCC (153 mg, 0.74 mmol)と 4-Butylphenol (77 mg, 0.51 mmol)を加えた。その後、ジクロロメタン 5 ml を追加し、DMAP (16 mg, 0.13 mmol)を入れ、常温で一 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を減圧濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離し、さらに、た。単離後、減圧濃縮、真空乾燥を行い、粘性の高い無色透明の液体の目的物を得た。Yield=112 mg (46%)

¹H NMR (500 MHz, solvent CDCl₃, standard TMS) δ 7.30 (d, 2H, Ar-H, *J*=2.3 Hz), 7.22 (d, 2H, Ar-H, *J*=8.6 Hz), 7.09 (d, 2H, Ar-H, *J*=8.6 Hz), 6.69 (t, 1H, Ar-H, *J*=2.6 Hz), 4.01 (t, 4H, Ar-OCH₂-, *J*=6.3), 3.67 (qi, 4H, -CH₂-OH, *J*=4.2 Hz), 2.63 (t, 4H, Ar-CH₂-, *J*=7.8 Hz), 1.82 (qi, 4H, Ar-OCH₂CH₂-, *J*=6.9 Hz), 1.64-1.59 (m, 6H, -CH₂-CH₂-OH, Ar-CH₂CH₂-), 1.54-1.40 (m, 8H, aliphatic-CH₂-), 1.33 (qi, 2H, Ar-CH₂CH₂CH₂-, *J*=6.0 Hz), 1.67 (br s, 2H, -OH), 0.93 (t, 3H, -CH₃, 7.2). ν/cm^{-1} (液膜法): 3350 (O-H str.), 2933, 2859 (C-H str.), 1738 (C = O str.), 1594, 1507 (C = Cstr.).

純度(HPLC) : 100%

2.1.3.10 1, 2-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (28)

Catechol (110 mg, 1 mmol) をジクロロメタン 10 ml 中に入れ、次に 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (480 mg, 2 mmol) を加えた。N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (500 mg, 2.4 mmol) と 4-(N, N'-dimethylamino)pyridine (240 mg, 4.0 mmol) を追加して、室温で 12 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶を行い、目的物を得た。Yield=290 mg (52.0%)

¹H NMR (500 MHz, solvent CDCl₃, standard TMS) δ 8.00 (d, 4H, Ar-H, *J* = 9.0 Hz), 7.37–7.31 (m, 4H, Ar-H), 6.83 (d, 4H, Ar-H, *J* = 8.9 Hz), 3.98 (t, 4H, -OCH₂-, *J* = 6.5), 3.66 (t, 4H, -CH₂-OH, *J* = 6.5 Hz), 1.81 (quin, 4H, -OCH₂-CH₂-, *J* = 7.0 Hz), 1.61 (quin, 4H, -CH₂-CH₂-OH, *J* = 7.0 Hz), 1.53–1.41 (m, 8H, aliphatic -CH₂-), 1.37 (br s, 2H, -OH). ν/cm^{-1} (KBr): 3317 (O-H str.), 2937, 2860 (C-H str.), 1737 (C=O str.), 1605, 1492 (C=C str.). Elemental analysis. Calculated for C₃₃H₄₀O₈: C, 70.19; H, 7.14. Found: C, 70.32; H, 6.80.

2.1.3.11 1, 3-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (29)

Resorcinol (110 mg, 1 mmol) をジクロロメタン 10 ml 中に入れ、次に 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (480 mg, 2 mmol) を加えた。N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (500 mg, 2.4 mmol) と 4-(N, N'-dimethylamino)pyridine (240 mg, 4.0 mmol) を追加して、室温で 6 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノールで再結晶を行い、目的物を得た。Yield=350 mg (63.0%)

¹H NMR (500 MHz, solvent CDCl₃, standard TMS) δ 8.13 (d, 4H, Ar-H, *J* = 8.7 Hz), 7.45 (t, 1H, Ar-H, *J* = 8.2), 7.16–7.13 (m, 3H, Ar-H), 6.96 (d, 4H, Ar-H, *J* = 8.8 Hz), 4.05 (t, 4H, -OCH₂-, *J* = 6.5 Hz), 3.68 (q, 4H, -CH₂-OH, *J* = 6.2 Hz), 1.85 (quin, 4H, -OCH₂-CH₂-, *J* = 7.0 Hz), 1.63 (quin, 4H, -CH₂-CH₂-OH, *J* = 7.0 Hz), 1.55–1.44 (m, 8H, aliphatic -CH₂-), 1.26–1.23 (br m, 2H, -OH). ν/cm^{-1} (KBr): 3378 (O-H str.), 2934, 2859 (C-H str.), 1731 (C=O str.), 1606, 1512 (C=C str.). Elemental analysis. Calculated for C₃₃H₄₀O₈: C, 70.19; H, 7.14. Found: C, 70.21; H, 6.87.

2.1.3.12 1, 4-Bis[4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoyloxy]benzene (30)

Hydroquinone (94 mg, 0.9 mmol) をジクロロメタン 10 ml 中に入れ、次に 4-(6-hydroxyhexyloxy)benzoic acid (430 mg, 1.8 mmol) を加えた。N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (370 mg, 1.8 mmol) と 4-(N, N'-dimethylamino)pyridine (22 mg, 0.18 mmol) を追加して、室温で 10 時間攪拌した。反応液から固体を濾別し、その濾液を

濃縮した。得られた固体から、ジクロロメタン/酢酸エチル(1/1)混合溶媒を展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーにより目的物を単離した。単離後、減圧濃縮し固体としたあと、エタノール/ヘキサン(1/1)の混合溶媒で再結晶を行い、目的物を得た。Yield=126 mg (25.0%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, solvent CDCl_3 , standard TMS) δ 8.15 (d, 4H, Ar-H, $J=9.2$ Hz), 7.26 (s, 4H, Ar-H), 6.98 (d, 4H, Ar-H, $J=9.1$ Hz), 4.06 (t, 4H, $-\text{OCH}_2-$, $J=7.6$ Hz), 3.68 (q, 4H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=6.1$ Hz), 1.85 (quin, 4H, $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-$, $J=6.9$ Hz), 1.63 (quin, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$, $J=7.0$ Hz), 1.54–1.45 (m, 8H, aliphatic $-\text{CH}_2-$), 1.24 (t, 2H, $-\text{OH}$, $J=5.5$). ν/cm^{-1} (KBr): 3402 (O-H str.), 2937, 2857 (C-H str.), 1730 (C=O str.), 1608, 1511 (C=C str.). Elemental analysis. Calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_8$: C, 70.19; H, 7.14. Found: C, 70.26; H, 6.85.

2.2 物性測定及び薬理活性評価方法

2.2.1 物性測定

合成した液晶性化合物が示す相同定及び相転移挙動の測定は、メトラー(FP80; Mettler Instrument AG)とホットステージ(FP82; Mettler Instrument AG)を付設した偏光顕微鏡(Optiphotopol Nikon Corp.)を用いて行った。また、測定時の昇降温速度は 5°C min^{-1} で行った。相転移温度と相転移エンタルピーの測定には示差走査熱量計(DSC, DSC6200; Seiko Instruments Inc.)を用いた。その際、化合物はアルミニウムパンに封入し、昇降温速度は 5°C min^{-1} で行った。リオトロピック液晶性は DMSO/水 混合系で評価した。化合物を溶解させ 10 mM とした DMSO 溶液を水に添加し、100 μM となるように調整した。サーマルステージ(TS62; INSTEC)と温度コントローラー(STC200; INSTEC)を付設し、偏光板を備えた光学顕微鏡(BX-51; Olympus Corp.)を用いて観察を行った。観察時の温度は、 37°C とした。

DMSO/水 混合系において観察された集合体の大きさを動的光散乱法(DLS: Dynamic light scattering, FDLS-3000L; Otsuka Electric Co. Ltd.)によって調べた。その溶液は 37°C とし、散乱角を 90° に固定した状態で He-Ne レーザー(632.8 nm)を用いて測定を行った。

臨界凝集濃度(CAC: critical aggregation concentration)を比較するために、紫外・可視吸収スペクトルを測定し、600 nm における吸光度を調べた。測定は、紫外可視近赤外分光光度計(Spectrophotometer JASCO V-670, 日本分光株式会社)で行った。濁度試験の試料は各化合物の 10 mM DMSO 溶液を水で段階希釈することにより調整した。

2.2.2 A549 細胞株培養及び薬理活性評価

液晶性化合物の薬理活性評価において、癌細胞としてヒト非小細胞肺癌細胞株 A549、ヒト結腸癌細胞 SW480、白血病細胞株 THP 1、肝癌細胞として HepG2 を用い、正常細胞として線維芽細胞株である WI-38 を使用した。A549、THP 1、HepG2 そして WI-38 は、RIKEN Bio-Resource Center(Tsukuba, Japan)より購入し、SW480 は American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)より購入した。細胞は、 37°C 、5% CO_2 存在下で、10% ウシ胎児血清(Bioserum, UBC, Japan)を含み、各細胞ごとに適した液体培地を用いて培養した。

各細胞で使用した液体培地を表 3-1 にまとめた。薬理活性評価を行う際には、24well-及び 12well-plate (Falcon, Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA)に 1 ml 播種した。(A549, SW480, WI-38: 4×10^3 cells/ml、HepG2: 1×10^4 cells/ml、THP1: 5×10^4 cells/ml)24 時間培養後、A549、SW480、WI-38 は培地を吸引し、各化合物を含む新しい培地を加えた。化合物を添加から培養した後(A549: 96 時間、SW480: 96 時間、)に、0.1% trypsin-EDTA (Gibco) で細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法にて生細胞数を計数した。通常、接着系の細胞では死細胞はディッシュ底に接着できず、浮遊する。接着細胞である SW480 は、化合物を添加していないコントロールにおいても浮遊細胞がみられ、接着細胞及び浮遊細胞の両方を分けずに回収した。コントロールにおいて浮遊細胞が存在するのは、SW480 細胞の培養では特徴的にみられることで、コントロールに用いた細胞の状態は良好であった。各化合物はあらかじめ DMSO に溶解し、10mM としたものを培地で希釈して、最終濃度になるように調製した。化合物を添加していないコントロールには、DMSO を添加した。THP 1 細胞は、血球系の浮遊細胞であり、トリプシンによる処理は不要で、培養から 72 時間後に回収し、生細胞数を計数した。

表 3-1 各細胞の種類と培養で用いた液体培地

Cell line	Tissue	Culture medium [※]
A549	Lung	DMEM
SW480	Colon	RPMI1640
THP 1	leukemia	RPMI1640
WI-38	fibroblast	MEME
HepG2	carcinoma	MEME

※ DMEM: Dulbecco's MEM (Gibco®, Invitrogen Corp., California, USA), RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Gibco®, Invitrogen Corp., California, USA), MEME: Minimum essential medium eagle (Sigma-Aldrich, Japan)

2.2.3 細胞周期測定

細胞周期測定を行う際には、60 mmφ の培養ディッシュ(Iwaki, Chiba, Japan)に、 3×10^4 cells/ml の濃度で 4 ml 播種した。24 時間培養後、培地を吸引し、各化合物を含む新しい培地を加えた。化合物添加から 24 時間および 48 時間培養した後に、0.1% trypsin-EDTA (Gibco) で細胞を回収し、トリパンブルー色素排除法にて生細胞数を計数した。回収した細胞は 70%エタノール溶液で固定処理し、1 晩以上置いた。解析の際には、PBS(-)で洗浄後、37°C で 30 分間 Ribonuclease (200 µg/ml)で処理し、その後、再度、PBS(-)で洗浄し propidium iodide (30 µg/ml)で核を 30 分間染色した。核染色は室温で遮光し行った。染色後、フローサイトメーター(Cytomics FC500, Beckman-Coulter, California, USA)で解析した。各化合物はあらかじめ

め DMSO に溶解し、10 mM としたものを培地で希釈して、最終濃度になるように調製した。化合物を添加していないコントロールには、DMSO を添加した。

2.2.4 統計処理

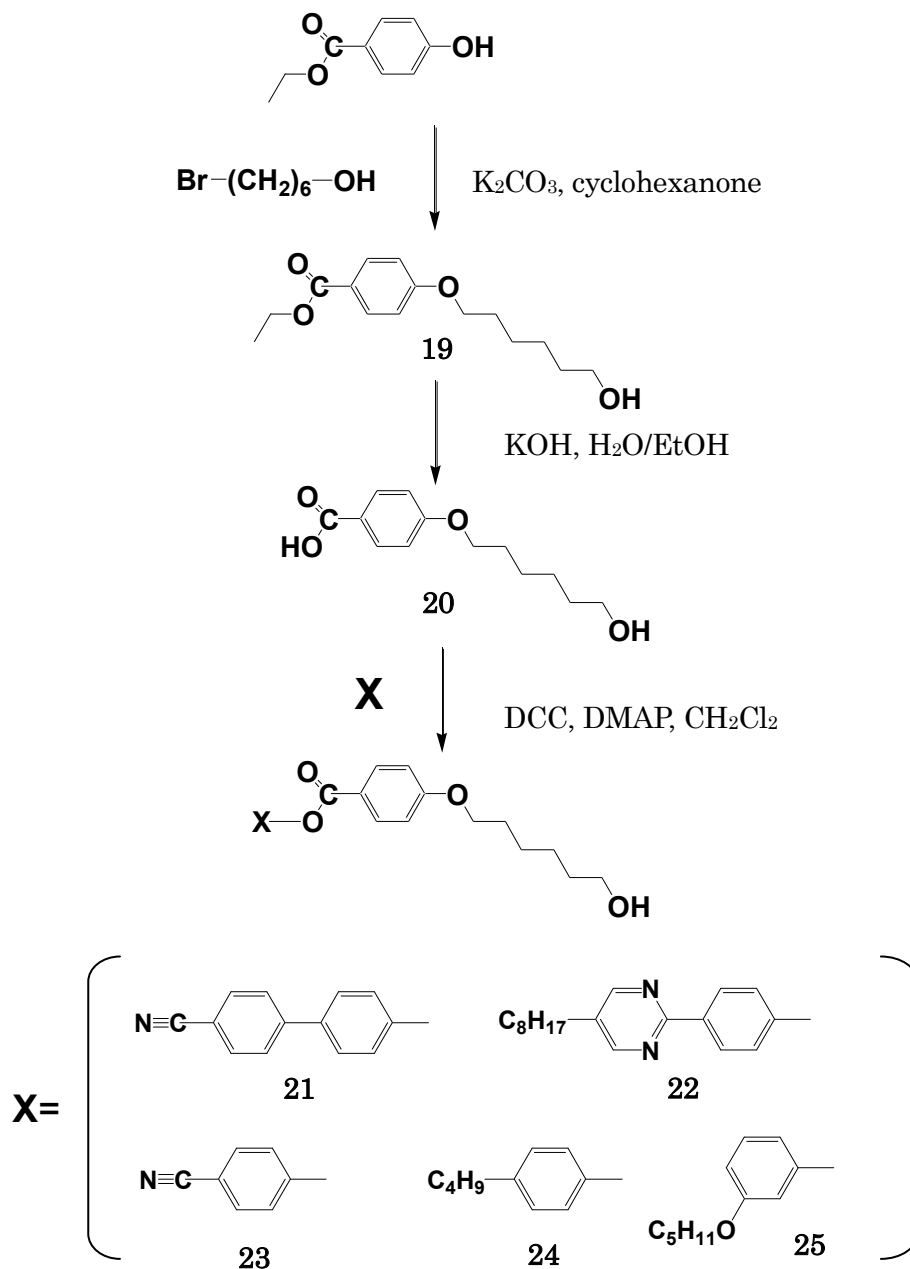
計数した細胞数がコントロールに対して差があるかどうかを判断するために、有意差検定を行った。本実験では、危険率を 5% とし、Mann-Whitney の U 検定および Student の t 検定で行った。

§ 3. 結果と考察

3.1 末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体

3.1.1 末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体の合成

Scheme 1 に従って、フェニルベンゾエート誘導体 19–25 を合成した。



Scheme 1 19-25 の合成スキーム

3.1.2 末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体の物性

図3-1に、合成した19-25の分子構造及び相転移温度(°C)、()内に相転移エンタルピー(kJ/mol)、そして融点(°C)を示す。[]内には等方相から冷却した時のみ発現した液晶相とその発現温度を示す。

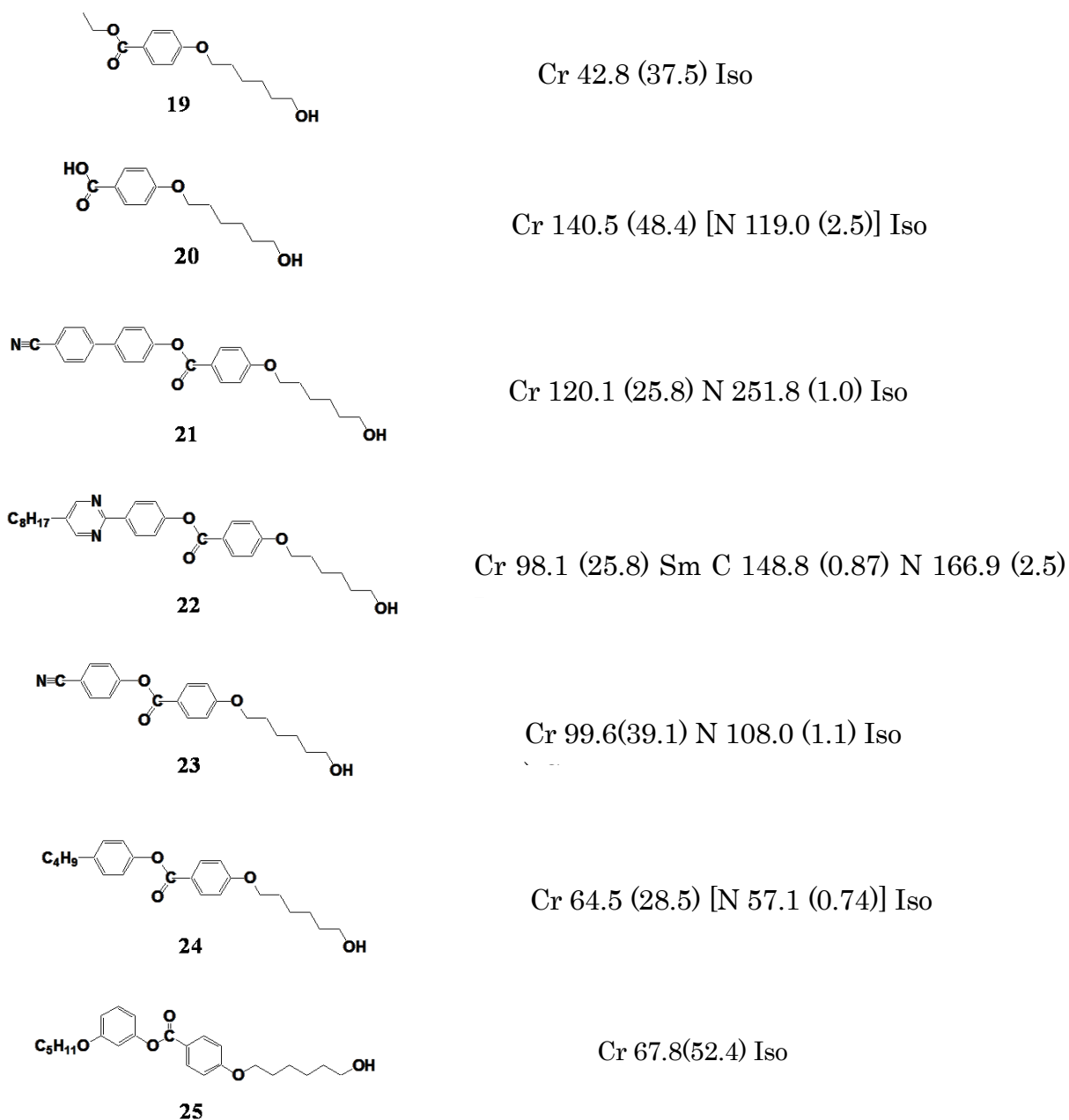


図3-1 フェニルベンゾエート誘導体19-25の分子構造及び相転移温度(°C)と相転移エンタルピー(kJ/mol)

3.1.3 末端ヒドロキシル基を1つ有するフェニルベンゾエート誘導体がA549細胞の増殖に及ぼす影響

図3-1に分子構造を示した化合物を用いて、非小細胞性肺癌細胞株A549の増殖に及ぼす影響を調べた。その結果を図3-2に示す。培地中の化合物の最終濃度は10 μM であり、化合物を添加せずDMSOのみを添加したコントロールの細胞数に対する細胞生存率を示す。

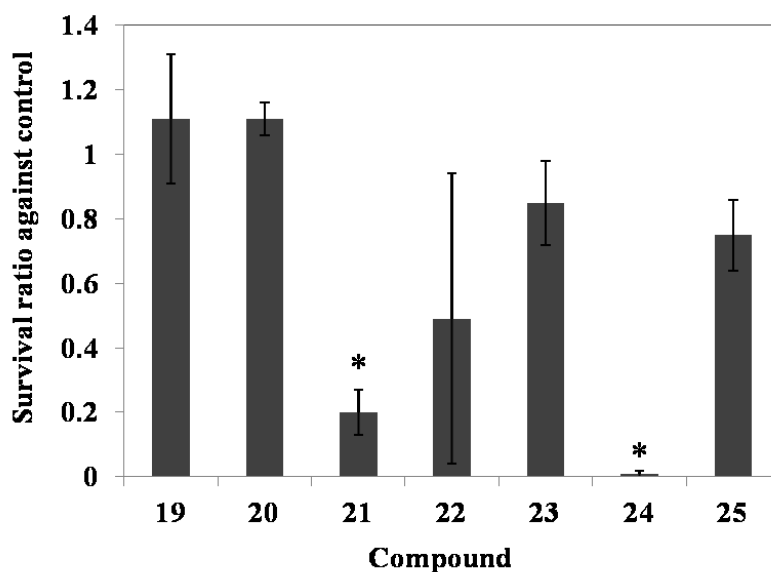


図3-2 19-25を培地に添加し、最終濃度を10 μM としたときのA549細胞の増殖に及ぼす影響

* $p < 0.05$ by student's

最もA549細胞の増殖を抑制したのは、4-ブチルフェニル基を有する24であり、その抑制率はコントロールに対して、99%であった。次に高い抑制率を示したのは、シアノビフェニル基を有する21で、細胞増殖を80%抑制した。オクチルアルキル鎖とフェニルピリミジンコアを有する22の抑制率は51%であり、23と25の抑制率は、15%および25%であった。有意差検定を行ったところ、21と24の抑制率はコントロールに対して有意差が認められたが、22については認められなかった。19や20のように、芳香環を1つ持つ化合物においてA549細胞の増殖抑制作用は観察されなかった。

A549細胞のような固形腫瘍においては、薬剤の効果を考える上で、細胞膜透過性が重要である。両親媒性の指標として、化合物のオクタノール/水分配比であるLog Pがあるが、Log Pと分子の極性表面積(tPSA)との相関から、細胞膜を透過する条件がEganらによってまとめられている。それによると、細胞膜透過における適正值は、 $-1 < \text{Log P} < 5.9$ 、 $\text{tPSA} < 132 \text{ \AA}^2$ である[9]。評価した19-25について、Log PとtPSAをChem Draw version 12.0を用いて算出した。図3-3に、各化合物のLog P値とtPSA値の相関をプロットした散布図を示す。

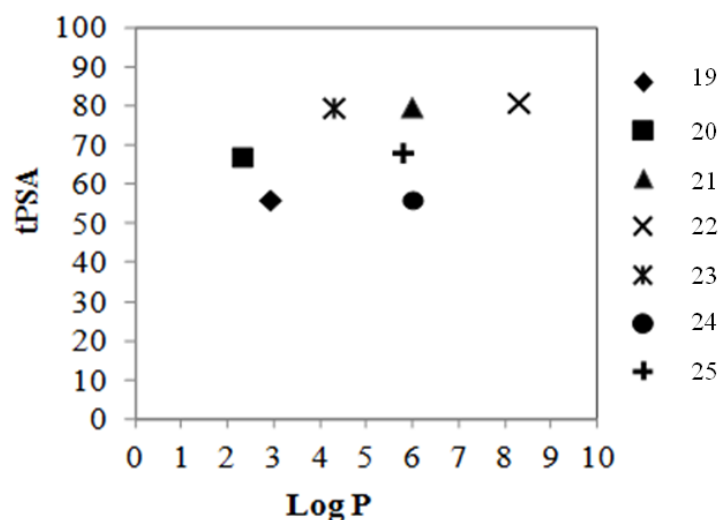


図 3-3 化合物 19-25 の Log P 値と tPSA 値の相関図

図 3-3 に示すように、評価したすべての化合物が Egan らによって与えられた tPSA 値を満たしていた。高い抑制作用を示した 21 及び 24、そして抑制作用を示さなかった 25 の Log P 値は同程度で、それぞれ、5.98、6.01、そして 5.80 であった。最も高い疎水性を示したのは、22 で 8.31 だった。21 及び 24 の Log P 値は Egan らによって与えられた適正範囲よりわずかに高いものの近い値であり、また tPSA 値を十分満たしていたことから、十分に細胞内に取り込まれると考えられる。一方、疎水性の高い 22 は、21 と 24 よりも細胞膜透過性は低いと予想され、24 に比べ抑制作用は低下した原因の一つであると考えられる。また、最も高い抑制作用を示した 24 の Log P 値である 6.0 を基準として、Log P 値が小さく親水性が大きくなるほど、抑制作用が低下する傾向が見られた。抑制作用を示す Log P 値には適正範囲が存在すると考えられる。しかしながら、21、24 そして 25 において、Log P 値が同程度であるにも関わらず、25 の抑制率は 25% と低かった。

次に、自己集合能の指標であるサーモトロピック液晶性と抑制作用との関連をまとめると、液晶性を有する 21、22 そして 24 は 50%以上の抑制作用を示した。液晶性を示すが、抑制作用が見られなかったのは 20 と 23 で、これらの Log P 値は、21、22 そして 24 よりも小さいものだった。一方、Log P 値が大きく、疎水性が高い 22 は抑制作用を示していた。液晶性を示さない 19 と 25 はいずれも抑制作用がみられなかった。ここまでの検討をまとめると、サーモトロピック液晶性を示し、Log P 値が 6.0 程度もしくは 6.0 以上の化合物で抑制作用が発現できるとわかった。サーモトロピック液晶性を有することは、自己集合能を有する指標となるが、評価した化合物は両親媒性であり、培地中においても自己集合できる可能性があるため、DMSO/水混合系における集合体形成能を偏光顕微鏡観察及び DLS によって調べた。また、臨界凝集濃度(Critical aggregation concentration :CAC)についても検討を行った。

3.1.4 集合体形成能

集合体形成能を評価するために、DMSO/水混合系においてリオトロピック液晶性を調べた。

各化合物の 10 mM DMSO 溶液を水に添加し、希釈していき、濃度を調整した。偏光顕微鏡下、19 と 20 で集合体は観察されなかった。一方、24 においては、100 μM 、37°C で、マルターゼクロステクチャーが観察された。その観察写真を図 3-4 に示す。マルターゼクロステクチャーが観察されたことから、24 は DMSO/水混合系において球状の集合体を形成できると考えられる。

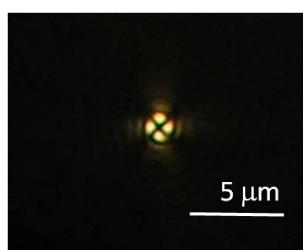


図 3-4 DMSO/水(1/99) 混合系において 24 が形成した集合体の偏光顕微鏡写真 (100 μM)

さらに、DLS を用いて、24 が形成した集合体の大きさを測定した。偏光顕微鏡観察では、100 μM 以下の濃度で集合体が観察されなかったが、より低い濃度においても集合体を形成できると考え、DLS で粒径を調べた。5 μM まで、平均粒径を測定することができた。得られた平均粒径は、5 μM で 166 nm (PDI: 0.06)、10 μM で 138 nm (PDI: 0.08)、20 μM で 134 nm (0.07)であった。得られた DLS プロファイルを図 3-5 に示す。

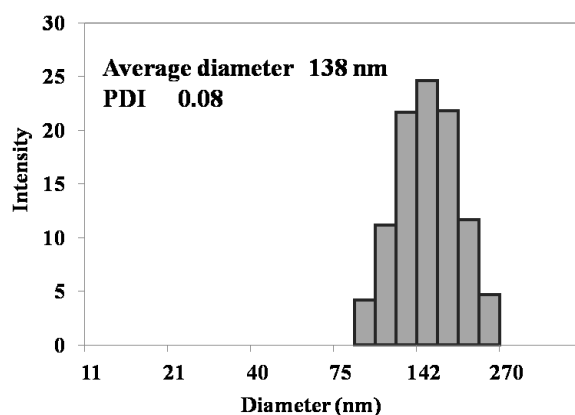


図 3-5 DMSO/水混合系で 24 (10 μM) が形成した集合体の DLS プロファイル

24 以外の化合物についても DLS によって、集合体形成能があるか調べた。各化合物の 10 mM DMSO 溶液を作り、水で段階希釈し、10 μM とした。DLS によって得られた各化合物の粒径と多分散度指数 (polydispersity index: PDI)、抑制率をまとめて表 3-2 に示す。

表 3-2 評価した化合物が示す集合体(DMSO/水 1: 999)の平均粒径と多分散度指数(PDI)および A549 細胞増殖抑制率(%)

化合物	平均粒径 (nm)	PDI	抑制率(%)
19	140.9, 1191.1 (多分散)	0.33	0
20	89.6, 1359.0 (多分散)	0.56	0
21	157.2	0.16	80
22	219.9	0.19	61
23	99.9, 854.3, 2030.9 (多分散)	0.33	15
24	138	0.08	99
25	167.2	0.04	25

高い抑制率を示した 21、22、そして 24 はいずれも単分散の系(測定で得られた粒径分布が一つ)を示し、得られた平均粒径はそれぞれ 157 nm、220 nm、そして 138 nm であった。一方、抑制作用が低かった 19、20、そして 23 は、多分散の系(測定により複数の粒径分布が得られた)を示した。25 は、単分散な系を示したが、その抑制率は 25% であった。

DMSO/水系において集合体を形成するための駆動力として疎水性相互作用が考えられる。そこで、各化合物の 10 mM DMSO 溶液を水で段階希釈することで、1 μ M、50 μ M、100 μ M、500 μ M、1 mM の濃度に調整し、各濃度における 600 nm の吸光度をプロットすることで、濁度を調べ、CAC を検討した。23 は、最も高い凝集能を示し、250 μ M 以上では、析出・沈殿が観察されたため、1 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M、100 μ M の濃度を調整した。結果を図 3-6 に示す。

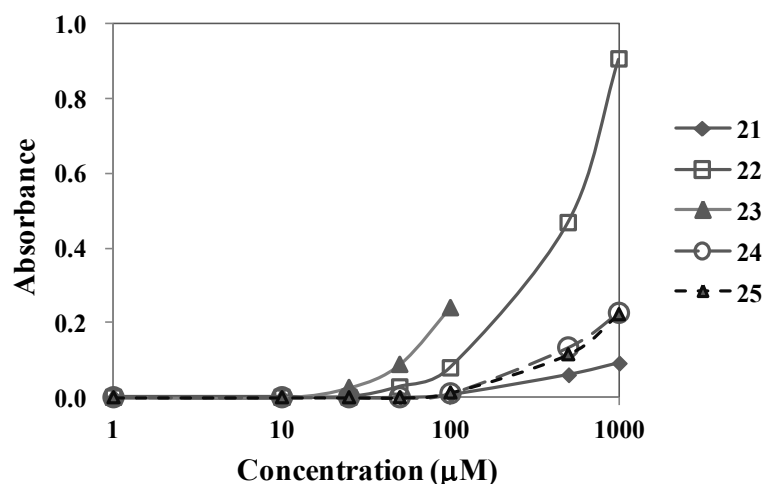


図 3-6 DMSO/水混合系における濁度試験

最も疎水性の高かった 22 の CAC が最も低く、次いで、23 が低い CAC 値を示した。これらの結果から、サーモトロピック液晶性、親水性・疎水性のバランスや集合体の粒径、そして CAC

を元に、得られた抑制作用を検討すると、集合体形成能のほかにサーモトロピック液晶形成能が抗腫瘍効果の発現に重要役割をもつことが分かった。

緒言で述べたように、固形癌は増殖の過程で不完全な血管を形成する。この癌組織における不完全な血管の内皮細胞間にできた隙間は、正常な血管では通り抜けない大きさの高分子系の薬剤を通すため、ドラッグデリバリーシステムにおいて、特定の大きさの薬剤を癌組織に特異的に蓄積させることが可能となっており、EPR 効果(Enhanced Permeation and Retention effect)と呼ばれる。24 の形成した集合体は、平均粒径が 100 – 200 nm 程度であるため、この EPR 効果を示す可能性がある。また、24 は分子末端にヒドロキシル基を有しており、両親媒性であることから、疎水部位を内側に向け、親水基であるヒドロキシル基を外側に向けた集合体を形成できると考えられる。集合体モデルを図 3-7 に示す。また、100 nm 以上の集合体を形成する 24 が、図 3-7 のように極性基が外に向いている場合、疎水性である細胞膜に対して、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられる。

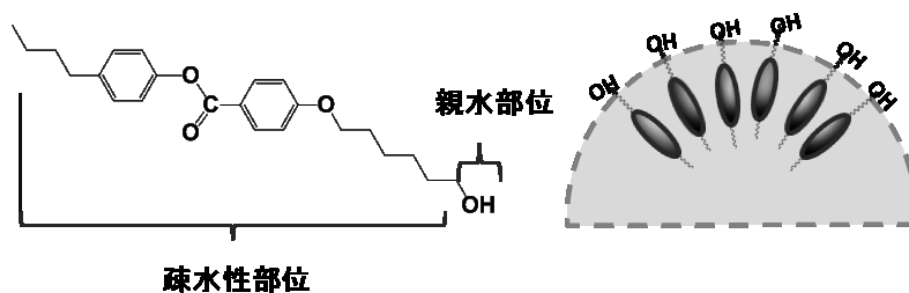


図 3-7 DMSO/水(1/99) 混合系における 24 の集合体モデル

3.1.5 抑制作用メカニズム

3.1.5.1 細胞抑制作用の濃度依存性

次に、10 μM で最も顕著な細胞増殖抑制作用が観察された 24 について、その抑制作用の濃度依存性を調べた。結果を図 3-8 に示す。

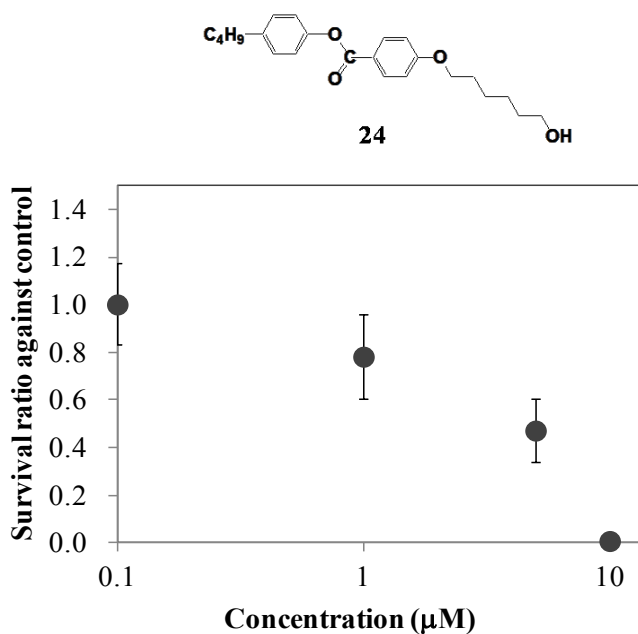


図 3-8 24 の A549 細胞増殖抑制作用の濃度依存性

24 の抑制作用には濃度依存性があり、5 μM –10 μM の範囲で抑制率は 46%もの増加を示していたことから、5 μM 以上において顕著に抑制作用を高めると考えられる。また、3 の細胞増殖を 50%抑制する濃度 (Inhibitory concentration: IC₅₀) は、4.7 μM であるとわかった。この濃度は、現在、肺癌などの固形腫瘍に対して用いられている既存の分子標的薬の A549 細胞の増殖を 50%抑制する濃度に匹敵する濃度であることから、24 が化学療法剤と成り得る可能性が示唆される[11]。

3.1.5.2 化合物 24 の細胞周期に及ぼす影響

A549 細胞の増殖抑制作用が最も高かった 24 の細胞周期に及ぼす影響を調べた。化合物を添加してから、24 時間後及び 48 時間後の細胞周期を調べた。また、化合物の培地中の濃度は、各時間で 10 μM と 20 μM の場合を用意した。細胞周期測定によって得られたヒストグラムを図 3-9 に示す。ヒストグラムは左側から、Sub G1 期、G1 期、S 期、G2/M 期と 4 つに分けられ、全細胞数に対する各周期の細胞数の割合を求め、コントロールと比較した。

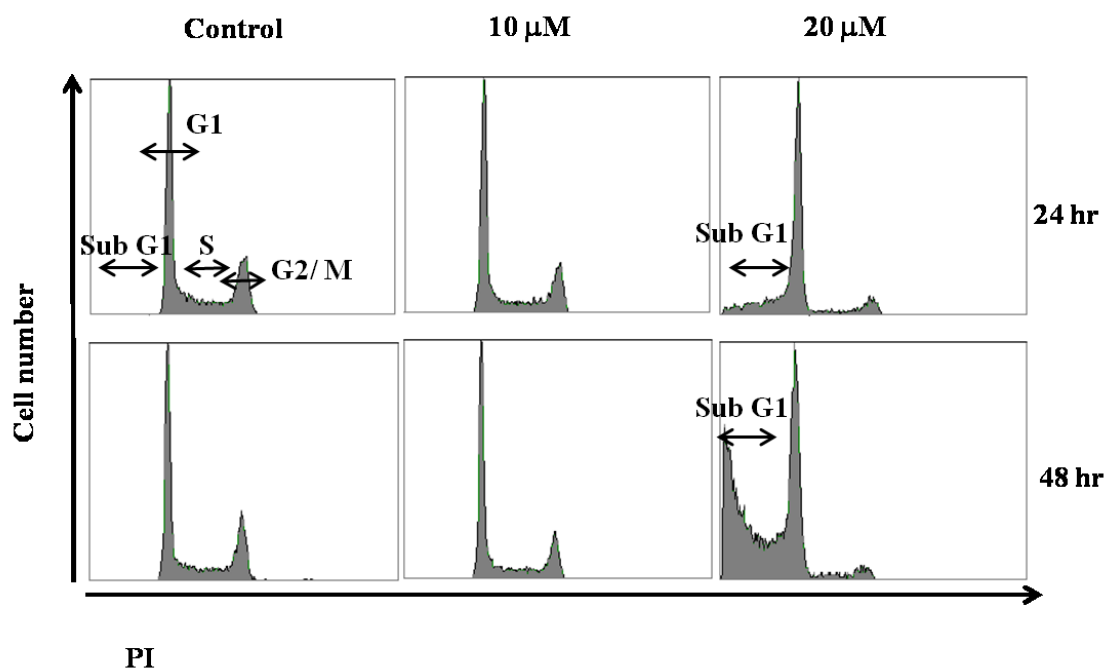


図 3-9 24 の A549 細胞増殖における細胞周期に及ぼす影響

24 が 10 μM の場合、48 時間が経過しても各細胞周期に存在する細胞数は、コントロールにおける細胞数と同程度で、細胞周期に大きな影響を及ぼしていないことがわかった。もし、いずれかの周期に作用して、細胞周期の停止を引き起こしているならば、いずれかの周期において顕著な細胞の蓄積が観察される。特定の周期に顕著な細胞の蓄積が観察されなかったものの、10 μM において、99%の細胞増殖抑制が観察されたことから、24 は 10 μM において全周期の進行を同程度に遅延させている可能性も考えられる。一方、20 μM の場合、24 時間後ですでに Sub G1 期に細胞の集積が観察された。その細胞集積率は、24 時間後に 33%、48 時間後では 61%であった。このとき、コントロールの Sub G1 期への細胞集積率は 1%未満であったことから、コントロールと 24 の誘起した Sub G1 期への細胞集積率に有意差が認められた。Sub G1 期へ集積する細胞は、DNA の断片化が引き起こされた細胞であり、24 は 20 μM の場合に、A549 細胞に対して、DNA 断片化を伴う細胞死を誘導できることが分かった。24 が誘起した細胞死は、24 時間以内という短時間で引き起こされたことや、培養時の細胞の様子で細胞の膨

潤や破裂が観察されなかったことから、自発的な細胞死であるアポトーシスであると考えられる。細胞周期測定における 24 の A549 細胞増殖抑制率は、10 μM の場合、24 時間後及び 48 時間後にそれぞれ 32% 及び 41% であり、20 μM の場合では、それぞれ 62% 及び 88% であった。さらに 10 μM の場合、96 時間後での抑制率は 44% であった。ここで得られた抑制率は図 3-2 に示したものと異なっている。その理由のひとつとして考えられることに実験条件の違いがあり、細胞周期測定ではスクリーニングに比べ、比較的多くの細胞数が必要であるため、その培養時の細胞密度は高くなっていることが挙げられる。24 が A549 細胞に及ぼす増殖抑制作用は細胞密度に対しても依存性があると考えられる。このように細胞密度が高くなるに従い、抑制作用が低下することは、肺癌の分子治療薬である Gleevec (STI-571, Imatinib) の A549 細胞の増殖に対する作用を検討した場合にも報告されている [12]。

次に A549 細胞が接着系の細胞であることに留意して、20 μM の場合について、培養ディッシュの底に付着している細胞と、培地内に浮遊している細胞とを分離して細胞周期測定を行った。結果を図 3-10 に示す。

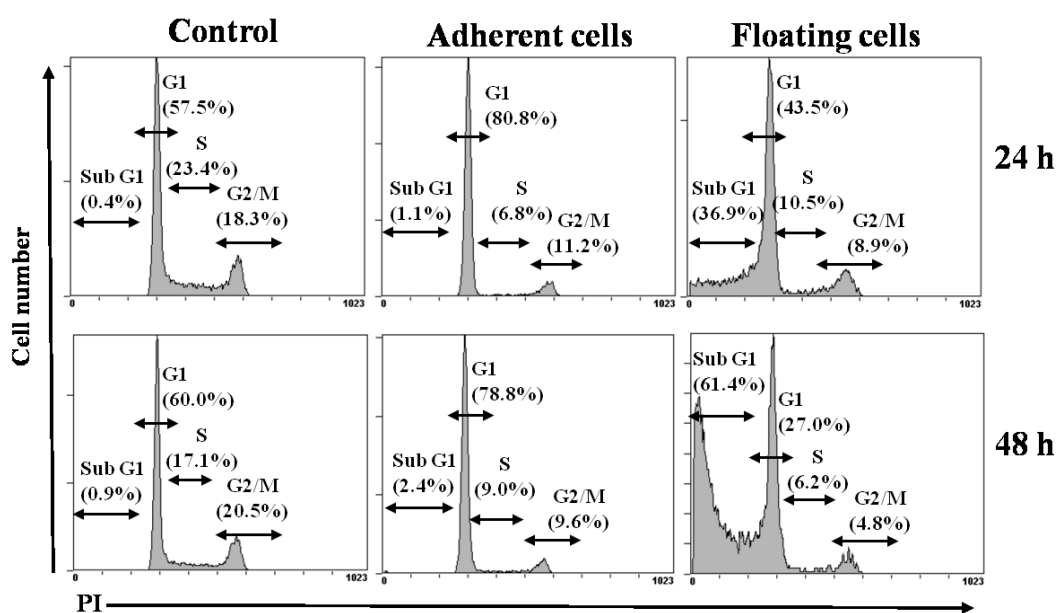


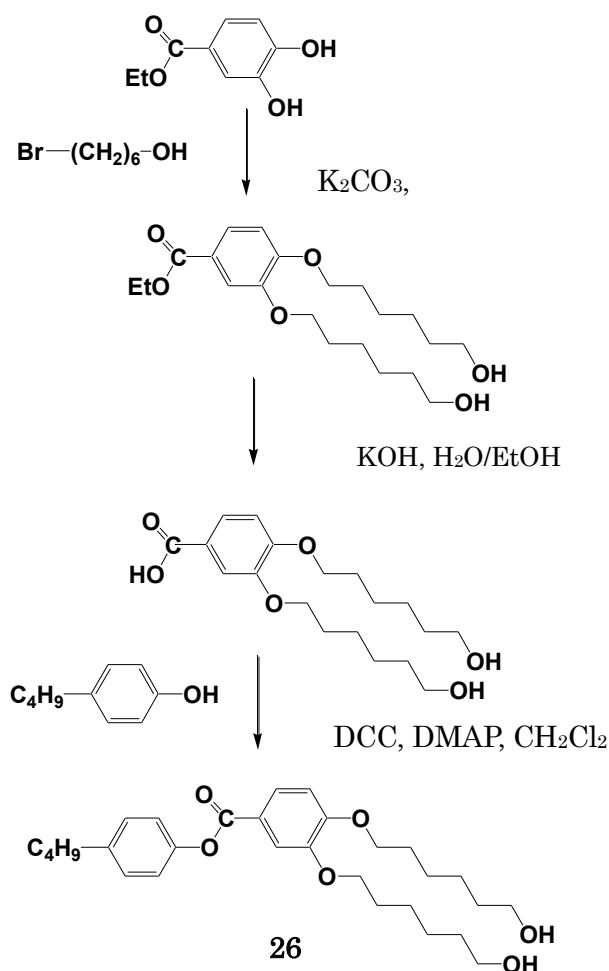
図 3-10 24 を 20 μM 添加し、接着細胞と浮遊細胞とを分けて処理した場合 A549 細胞増殖における細胞周期に及ぼす影響

接着細胞の場合、24 時間後及び 48 時間後ともに、コントロールに対して G1 期に細胞が集積しており、G1 期において細胞周期の停止が引き起こされていると分かった。一方、培地中に浮遊している細胞では、Sub G1 期に顕著な細胞集積が観察された。これらのことから、24 によって引き起こされた DNA 断片化を伴う細胞死は、G1 期の停止を経て誘起されると分かった。

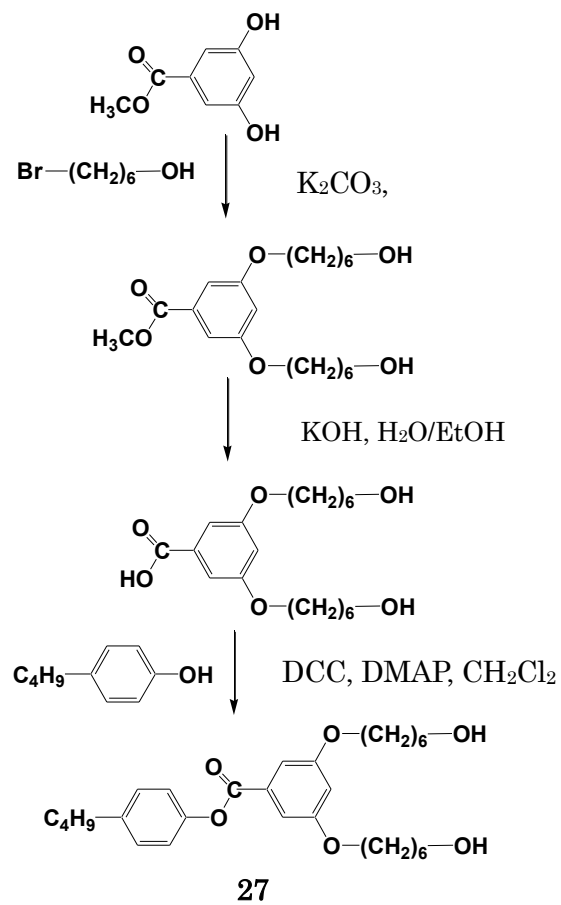
3.2 末端ヒドロキシル基を二つ有するフェニルベンゾエート誘導体

3.2.1 末端ヒドロキシル基を二つ有するフェニルベンゾエート誘導体の合成

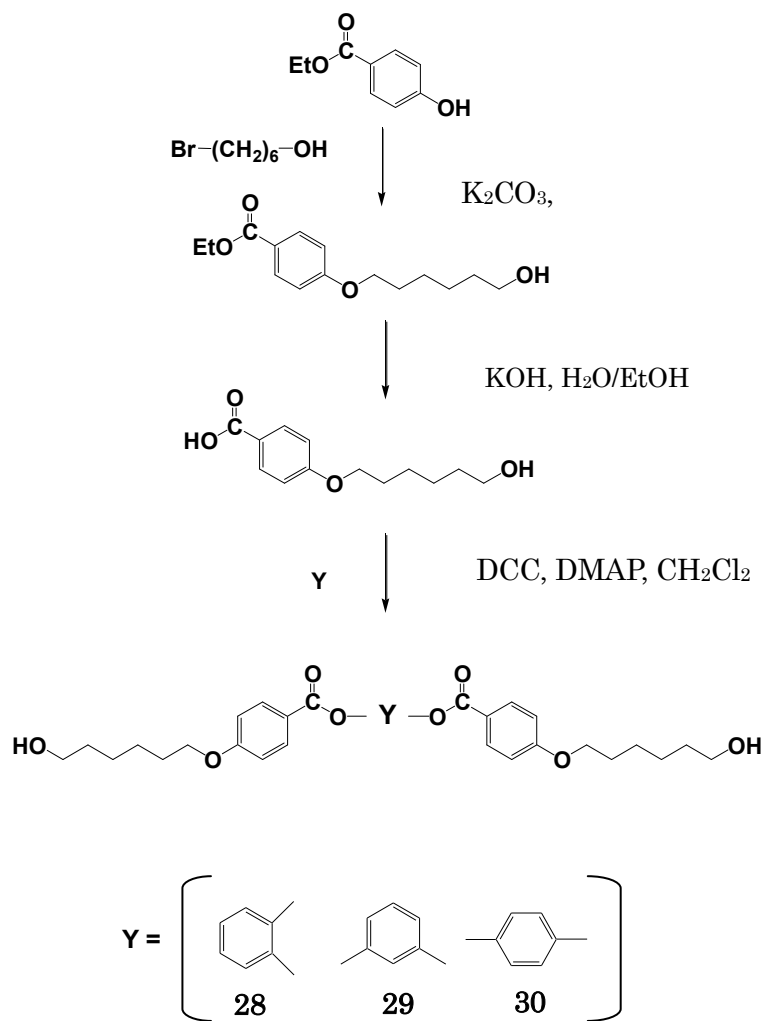
分子末端に一つのヒドロキシル基を有するフェニルベンゾエート誘導体を合成し、それらの腫瘍細胞に対する活性と分子構造及び集合体形成能について検討し、細胞膜透過に必要な両親媒性に加え、サーモトロピック液晶性が抑制作用に重要な役割を示すことが分かった。集合体形成能を有する 24 は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる可能性が示唆され、DNA 断片化を伴う細胞死を誘導できると分かった。そこで、24 が細胞内でタンパク質や核と相互作用できると仮定し、その相互作用を検討する目的で、末端ヒドロキシル基を二つ有する 26-30 を合成し、それらの A549 細胞増殖に及ぼす影響を調べた。26 と 27 の合成は Scheme 2 及び Scheme 3 に従って行い、28-30 の合成は Scheme 4 に従って行った。



Scheme 2 26 の合成スキーム



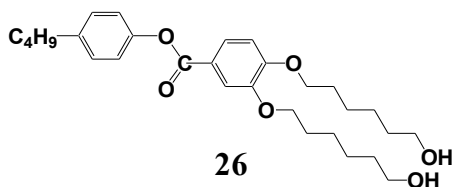
Scheme 3 27 の合成スキーム



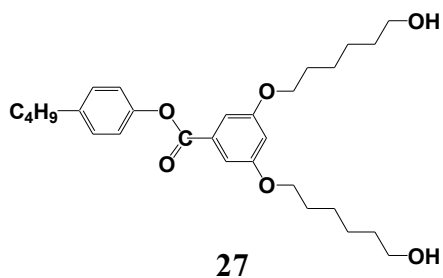
Scheme 4 28-30 の合成スキーム

3.2.2 末端ヒドロキシル基を二つ有するフェニルベンゾエート誘導体の物性

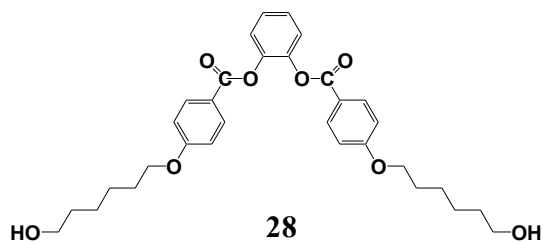
図 3-11 に、合成した化合物の分子構造及び相転移温度(°C)、()内に相転移エンタルピー(kJ/mol)を示す。[]内には等方相から冷却した時のみ発現した液晶相とその発現温度を示す。



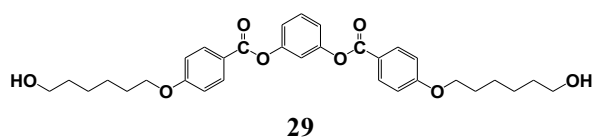
Cr 64.7(43.1)[N 56.2 (1.2)] Iso



-40°C まで冷却したが液体だった



Cr 71.4(36.1) Iso



Cr 109.4 (42.8) Iso



Cr 164.6 (36.8) N 223.7 (2.4)

図 3-11 26-30 の分子構造及び相転移温度(°C)と相転移エンタルピー(kJ/mol)

3.2.3 末端ヒドロキシル基を二つ有するフェニルベンゾエート誘導体の A59 細胞増殖抑制作用

図 3-11 に分子構造を示した化合物を用いて、非小細胞性肺癌細胞株 A549 の増殖に及ぼす影響を調べた。その結果を図 3-12 に示す。比較のために 24 の結果も併せて示した。培地中の化合物の最終濃度は 10 μM であり、化合物を添加せず DMSO のみを添加したコントロールの細胞数に対する細胞生存率を示す。30 は培地中で結晶が析出したため、評価できなかった。

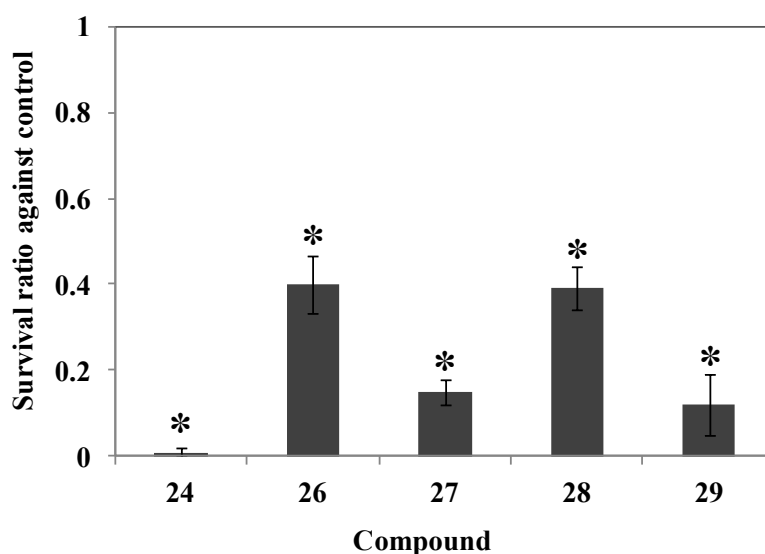


図 3-12 24 及び 26-29 を培地中 10 μM となるように添加した時の A549 細胞の増殖に及ぼす影響

A549 細胞の増殖を顕著に抑制したのは、27 と 29 で、その抑制率はそれぞれ、コントロールに対して、85%及び 88%であった。また、26 および 28 の抑制率はそれぞれ 60%および 51%であった。いずれの化合物も、化合物を添加していないコントロールに比べ、A549 細胞の増殖を有意に抑制できた。得られた抑制率について、26 と 27、そして 28 と 29 とを比べると、いずれも、ベンゼン環上において末端ヒドロキシル基の置換位置が隣り合っている α 位 (26 と 28) よりも、炭素を一つ挟んで置換している β 位 (27 と 29) に、末端ヒドロキシル基が位置する場合に抑制効果が高まるとわかった (β 効果)。末端ヒドロキシル基の置換位置と抑制作用とに顕著な相関がみられた。

次に、これら 4 つの化合物の Log P (オクタノール/水の分配比) 及び tPSA (分子の極性表面積) を Chem Draw Ultra Version 12.0 を用いて求めた。Log P については、26 と 27 は共に 6.76 となり、28 と 29 は共に 6.5 となった。tPSA については、26 と 27 は共に 85.2 であり、28 と 29 は共に 111.52 であった。Egan らが報告している細胞膜を透過するための条件となる、Log P と tPSA の適正值が、 $-1 < \text{Log P} < 5.9$ 、 $\text{tPSA} < 132 \text{\AA}^2$ となっている [9] ことから、これら 4

つの化合物は、Log P 値を満たさず、tPSA 値のみを満たしていた。評価した 4 つの化合物の抑制率は、いずれも 24 よりも低かった。24 の Log P 値が 6.0 であったことから、この抑制率の違いは、細胞膜透過に対する活性の違いによるものと考えられる。Log P 値を満たすような設計を加えることで、さらに高い抗腫瘍効果を示すことが期待される。

3.2.4 細胞抑制作用の濃度依存性

次に、各化合物の示した抑制作用の濃度依存性を調べた。結果を図 3-13 に示す。26 と 27 については、5, 10, 20 μM の場合について、また 28 及び 29 については、0.1-20 μM において調べた。

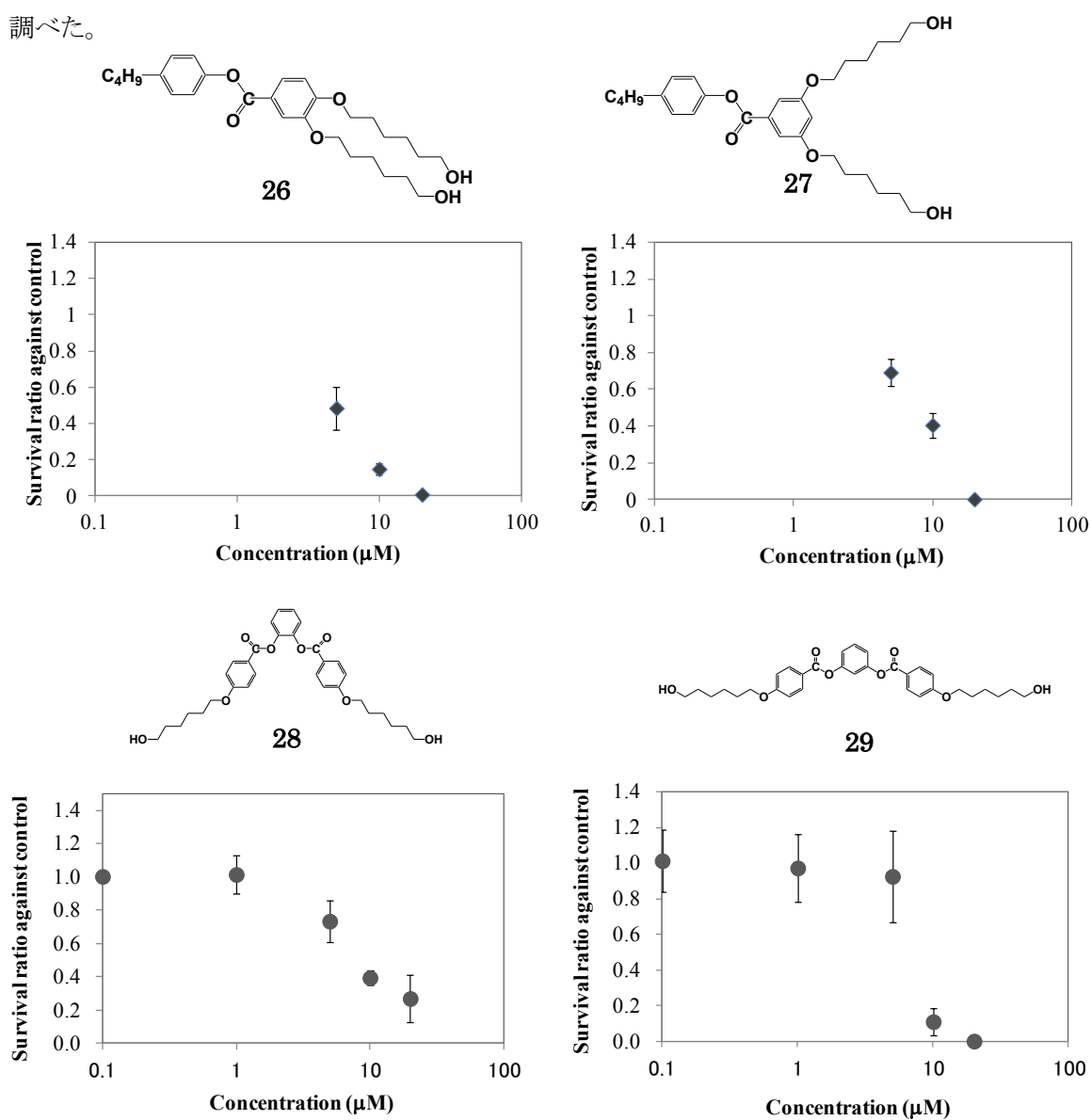


図 3-13 26-29 の A549 細胞の増殖抑制作用の濃度依存性

26 と 27 において 5–20 μM の範囲で、そして 28 においては 1–20 μM の範囲において濃度が高くなるにつれて、徐々に細胞増殖抑制率も高まった。一方、29 においては、5 μM から 10 μM へ濃度が増える際に、急激に抑制率が高まった。29 において、他の 3 つの化合物とは異なる抑制作用メカニズムを示す可能性が考えられる。26 と 27 は、24 の分子内にヒドロキシル基を増やすことで抑制作用が高まることを期待したものの、抑制作用を高めることは出来なかった。一方、28 と 29 は、2 つの末端ヒドロキシル基の位置が制御されている。また、28 と 29 の抑制作用の濃度依存性が顕著に異なる挙動を示すことから、28 と 29 が、24 とは異なる抑制メカニズムを示すことを期待し、その詳細を調べるために、細胞周期測定を行った。

3.2.5 28 と 29 の細胞周期に及ぼす影響

化合物の濃度は 10 μM 及び 20 μM として、化合物を添加してから、24 時間後及び 48 時間後の細胞周期を図 3–14 に示した。また、各時間における抑制率および Sub G1 期における細胞の集積率を表 3–3 に示す。

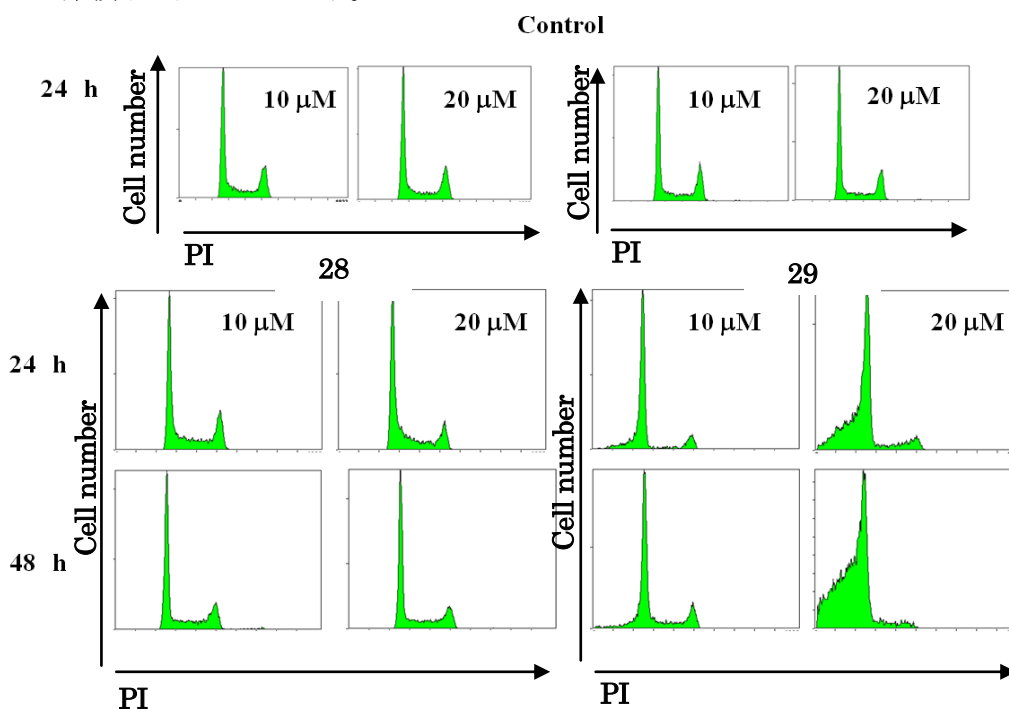


図 3–14 28 と 29 を培地中 10 μM となるように添加した時の A549 細胞増殖における細胞周期に及ぼす影響

表 3-3 28 と 29 を添加したときの Sub G1 期の細胞集積率(%)

※()内は、対応する細胞周期測定時の抑制率

	28		29	
	10 μ M	20 μ M	10 μ M	20 μ M
24 h	0.6 (21)	1.5 (41)	24.1 (52)	46.4 (56)
48 h	0.8 (34)	0.8 (60)	20.7 (81)	63.8 (93)

図 3-14 のヒストグラムから分かるように、10 μ M の時に A549 細胞の増殖に対して細胞周期に影響を及ぼしたのは 29 のみで、Sub G1 期に細胞の蓄積が見られた。29 は、添加してから 24 時間後、全細胞の 24.1%の細胞に、また 48 時間後、20.7%の細胞に DNA の断片化を誘起した。このことは、29 が A549 細胞に DNA 断片化を伴う細胞死を誘導できることを示す。表 3-3 に示すように、29 を 20 μ M 添加したときには、48 時間で 63.8%の細胞に細胞死を誘導できた。一方で、28 は、20 μ M 添加した場合においても、Sub G1 期に細胞を蓄積させていなかった。28 は、図 3-12 に示したように 51%の細胞増殖抑制率を示したが、G1 期、S 期、G2/M 期といった周期にも細胞を蓄積させておらず、コントロールと差が見られなかった。抑制作用が見られた場合、いずれかの周期に作用を及ぼしていれば、細胞の蓄積が観察されるはずである。28 は、増殖抑制作用を示したことから、細胞周期を停止させていると考えられるが、その示した抑制作用は、特定の周期に作用することで停止を誘導するものではなかった。二量化することによって、抑制作用が高められる報告はあるものの[6]、このような置換位置によって細胞死の誘導能が異なる例は、我々の調べた限りでは報告がない。

図 3-14 で得られた結果を考察する際に、29 の A549 細胞増殖抑制率が、24 よりも低いことを述べたが、細胞周期へ及ぼす影響について比較してみると、29 は 10 μ M で細胞死を誘導できたのに対して、24 は 10 μ M で、Sub G1 期に細胞を蓄積させず、細胞死を誘起できていなかった。29 は分子中央にベンゼン環を含むことによって、24 に比べ、末端ヒドロキシル基の位置が制御されている。位置の異なる末端ヒドロキシル基によって、抑制作用に違いが見られたことは、末端ヒドロキシル基が、抑制作用の発現において、タンパク質や核などと相互作用できることを示唆する。28 と 29 の分子構造の違いをより明確に捉えるために、MOPAC-6/PM3 を用いて、真空中における分子のコンフォメーションを得た。結果を図 3-15 に示す。

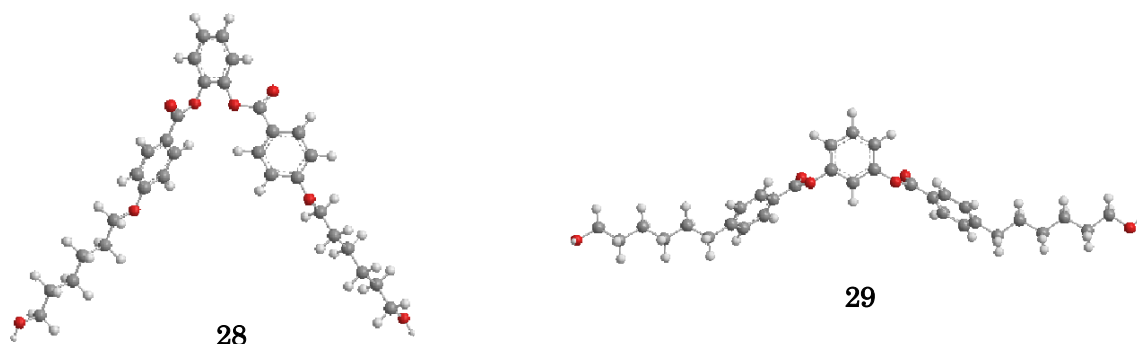


図 3-15 MOPAC-6/ PM3 より得た 28 と 29 のコンフォメーションモデル

28 の分子形状は 29 よりも屈曲していると分かった。また、評価した化合物から得た構造-活性相関から、末端ヒドロキシル基が作用し、その後でエステル基が作用するという段階的な作用の仕方も考えられる。28 は細胞周期を停止される作用を誘起するのに対して 29 は細胞死も誘起できることを考慮すると、28 はヒドロキシル基のみで作用し、エステル基による作用は少なく、一方で、分子形状がより棒状に近い 29 ではヒドロキシル基とエステル基の両方によって作用できると考えられる。28 と 29 は、それぞれ細胞周期に異なる影響を及ぼし、28 は細胞周期の進行を停止させ、29 は DNA 断片化を伴う細胞死を誘起した。28 及び 29 が示した作用は、化合物 24 の 10 μM および 20 μM に対応している。このことから、24 は 10 μM の時に、28 のようにヒドロキシル基のみで作用を及ぼし、20 μM の時には、化合物 29 のように、ヒドロキシル基とエステル基が共に作用していると示唆される。二つの末端ヒドロキシル基を有する化合物 28 と 29 の活性を評価することから、化合物 24 の抑制作用発現における核との相互作用を考察できた。

3.3 固形癌細胞、血球細胞、正常細胞に及ぼす影響

24、28 そして 29 は固形腫瘍である肺癌の細胞株 A549 細胞に対して、顕著な増殖抑制作用を示した。一方で、分子末端にアルコールを有するシアノビフェニル誘導体において、末端ヒドロキシル基の位置の違いによって、癌細胞と正常細胞に及ぼす影響に違いがみられていることが報告されている。28 と 29 の抑制作用メカニズムにおいても、末端ヒドロキシル基の位置が重要な役割を果たしていたことから、線維芽細胞 WI-38 に及ぼす影響を調べた。また、A549 細胞以外の固形癌細胞に及ぼす影響、また、血球系の癌細胞への影響を調べるために、加えて結腸癌細胞株 SW480、白血病細胞株 THP1、肝癌細胞株 Hep G2 を用いて薬理活性評価を行った。結果を図 3-16 に示す。

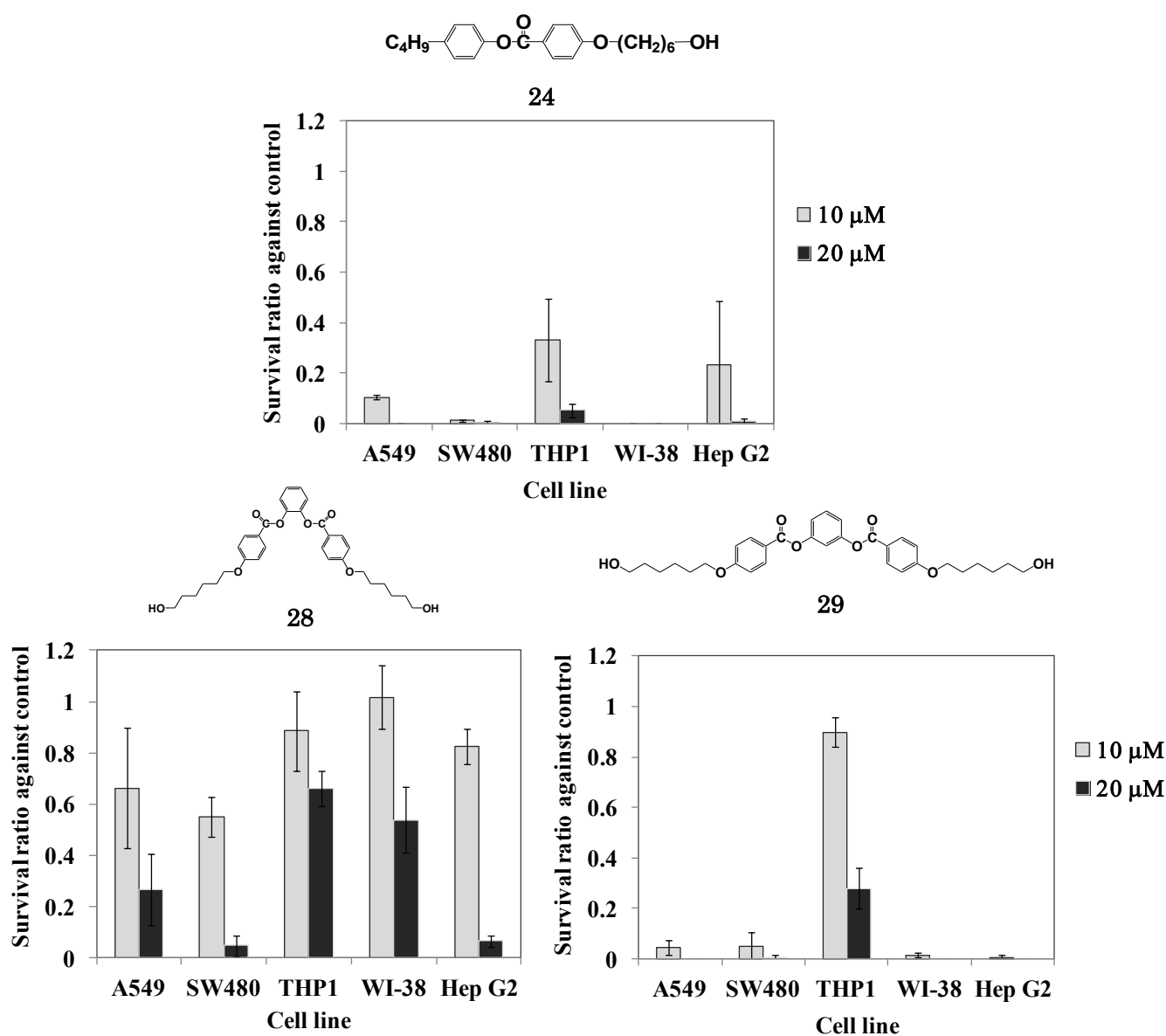


図 3-16 24、28 及び 29 を培地中 10 μM 及び 20 μM となるように添加した時の薬理活性作用

正常細胞 WI-38 に対して、化合物 24 と 29 はいずれも増殖に影響を及ぼした。化合物 24 も 1 級の末端アルコールを有するものの、シアノビフェニル誘導体をは正常細胞に及ぼす影響とは異なっていた。20 μ M の場合に、化合物 24 と 29 はすべての細胞の増殖を顕著に抑制した。一方、化合物 28 は固形腫瘍に対して増殖抑制率が高かった。固形腫瘍である SW480 と Hep G2 の増殖を顕著に抑制したのは、化合物 24 と 29 であった。すべての化合物において、血球系の腫瘍細胞である THP1 に及ぼす影響は固形腫瘍に対するものよりも低い抑制作用を示す傾向がみられた。

§ 4. 結言

フェニルベンゾエート誘導体及び対応する安息香酸を合成し、その A549 細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。得られた抑制作用と、分子構造から推定される細胞膜透過性や集合体形成能との相関を検討したところ、細胞膜透過に重要と考えられる親水性・疎水性のバランスに加え、サーモトロピック液晶形成能が抗腫瘍効果の発現に重要な役割をもつことが分かった。

最も顕著に A549 細胞の増殖を顕著に抑制した 24 は、その IC₅₀ 値は 4.7 μM で、20 μM のときにアポトーシスを誘起できた。また、サーモトロピック液晶性を示す 24 の自己集合能に着目し、DMSO/水系における集合体形成能を調べたところ、DLS 測定から 138 nm の平均粒径が得られ、EPR 効果を示せることがわかった。

24 の抑制作用における細胞核との相互作用を検討するために合成した 28 と 29 の A549 細胞の増殖に及ぼす影響を評価したところ、細胞周期への影響が異なり、抑制作用メカニズムに違いがあった。24 の抑制作用の濃度依存性と比べると、29 では、24 が 20 μM の場合と同様に細胞死を誘導し、28 では、24 が 10 μM の場合と同様に細胞周期の停止を引き起こした。28 と 29 における抑制作用の濃度依存性及、分子構造、そしてエステル基とヒドロキシル基の作用の違いから、24 の抑制作用の発現を考察すると、24 は 10 μM ではヒドロキシル基で作用し細胞周期の停止を誘起するのみで、20 μM においては、29 のようにエステル部位とヒドロキシル基の両方で作用することで、細胞死を誘起できると考えられる。24 の抑制作用発現機構の概略図を図 3-17 に示す。24 は集合状態を形成し、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入でき、細胞内においてヒドロキシル基及びカルボニル基によって作用すると考えられる。自己集合能を有する単純な液晶性分子で、A549 細胞に対してアポトーシスを誘起できた。また、その抑制作用メカニズムにおける核との相互作用を考察できた。

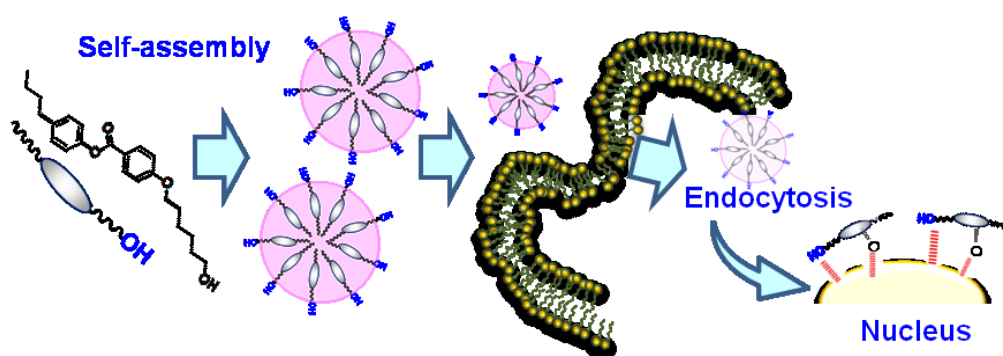


図 3-17 24 の A549 細胞の増殖抑制作用メカニズム発現の模式図

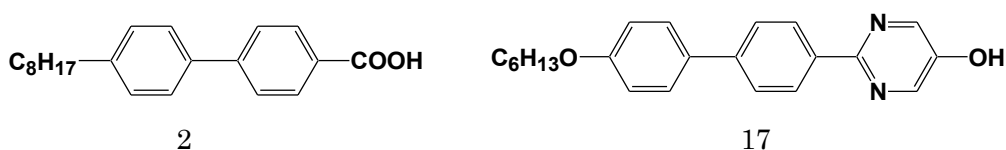
§ 5. 参考文献

- 1 A. J. Primeeau, A. Rendon, D. Hedley, L. Lilige and I. F. Tannock, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 8782-8788(2005)
- 2 S. F. Yu, Z. Wang, G. L. Wu, Y. N. Wang, H. Gao, and J. B. Ma, *Acta Polym. Sin.*, **4**, 427-432(2012).
- 3 J. Wang, Y. Wang, and W. Liang, *J. Control. Release*, **160**, 637-651(2012).
- 4 A. A. Gabizon, D. Tzemach, A. T. Horowitz, H. Shmeeda, J. Yeh, and S. Zalipsky, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 1913-1920 (2006).
- 5 J. Ding, F. Shi, C. Xiao, L. Lin, L. Chen, C. He, X. Zhuang, and X. Chen, *Polym. Chem.*, **2**, 2857-2864(2011).
- 6 J. Hu, Y. Su, H. Zhang, T. Xu, and Y. Cheng, *Biomaterials*, 2011, **32**, 9950-9959.
- 7 A. Yoshizawa, Y. Takahashi, A. Nishizawa, K. Takeuchi, M. Sagisaka, K. Takahashi, M. Hazawa, and I. Kashiwakura, *Chem. Lett.*, **38**, 530-531 (2009).
- 8 Y. Takahashi, M. Hazawa, K. Takahashi, M. Sagisaka, I. Kashiwakura, A. Yoshizawa, *Med. Chem. Commun.*, **2**, 55-59 (2011)
- 9 W.J. Egan, K. M. Merz and J. J. Baldwin, *J. Med. Chem.* **43**, 3867-3877 (2000)
- 10 Y. Takahashi, M. Hazawa, K. Takahashi, A. Nishizawa, A. Yoshizawa, and I. Kashiwakura, *Invest. New Drugs*, **29**, 659- 665 (2011).
- 11 J. K. Rho, Y. K. Choi, J. K. Lee, B. Ryoo, I. I. Na, S. H. Yang, C. H. Kim, J. C. Lee, *Lung Cancer*, **63**, 219-226 (2009)
- 12 P. Zhang, W. Y. Gao, S. Turner and B. S. Ducatman, *Mol. Cancer*, **2**, 1-9 (2003).

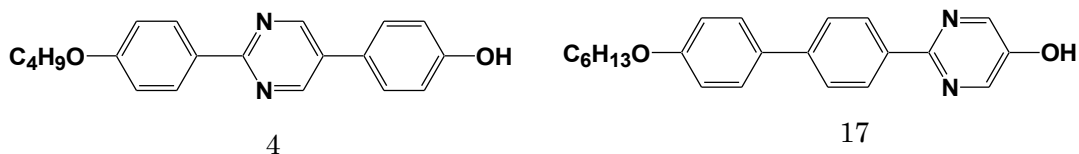
総括

本論文では、生体機能の発現に液晶性が重要な役割を果たしていることに着目し、液晶性化合物の薬剤としての応用を目指して薬理活性作用を検討した。第一章では血小板産生を促進する低分子化合物を得る目的で、末梢血由来造血幹細胞からの血小板産生過程に及ぼす影響を調べた。また第二章では浮遊系の慢性骨髄性白血病細胞株 **K562** に対して、第三章では付着系の非小細胞肺癌細胞株 **A549** に対して **nM** オーダーで効果を示す低分子化合物を得る目的で、それらの増殖に及ぼす影響を調べた。

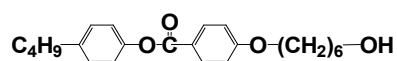
1. 棒状液晶性化合物を用いて血小板産生過程に及ぼす影響を評価したところ、いくつかの液晶性化合物が造血幹細胞数、巨核球数を増やした。特に **17** が、サイトカインである **IL-3** より高い血小板増殖促進能を示した。血小板数を増やした化合物 **2** と **17** は、生体内で産生されたものと同等の機能をもつ血小板を増やした。本研究で、末梢血由来の造血幹細胞に対して、ポジティブコントロールとして用いた **IL-3** や **GM-CSF** とは異なる作用機序をもつ新たな低分子化合物を提案できた。



2. 液晶性化合物を用いて、慢性骨髄性白血病細胞株 **K562** の増殖に及ぼす影響を評価したところ、コア部分に一つのピリミジン環を含む3つの芳香環をもち、分子末端にヒドロキシル基をもつ **4** と **17** が高い増殖抑制作用を示した。**4** と **17** の IC_{50} 値はそれぞれ、 $7.2 \mu\text{M}$ 及び $9 \mu\text{M}$ で、既存の分子標的薬よりも高い濃度だった。**4** は DNA 断片化を伴うアポトーシスを誘導し、**17** は細胞周期の停止を誘起した。細胞周期に及ぼす影響に、ピリミジン環やアルコキシ鎖長は重要な役割を果たしていることが分かり、新たな構造-活性相関を示せた。



3. 分子末端にヒドロキシル基を有するフェニルベンゾエート誘導体を合成し、癌細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。非小細胞肺癌細胞株 **A549** の増殖に及ぼす影響を評価したところ、**24** は濃度によって増殖抑制作用が異なり、 $10 \mu\text{M}$ では細胞周期を停止させ、 $20 \mu\text{M}$ では細胞死を誘起した。また、**24** は自己集合能を示した。



24

24 の自己集合能に着目して、二つの末端ヒドロキシル基を含むフェニルベンゾエート誘導体を合成し A549 細胞の増殖に及ぼす影響を調べたところ、10 μM で 24 はヒドロキシル基によって作用を及ぼしており、20 μM では、ヒドロキシル基とエステル基の両方で作用していると考察できた。24 の作用メカニズムの概略を以下の模式図に示す。24 は球状の集合体を形成し、細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれることが可能である。細胞内に侵入後、核に到達し、10 μM では末端ヒドロキシル基で核と相互作用し、20 μM では、ヒドロキシル基とエステル基が共に相互作用すると考えられる。

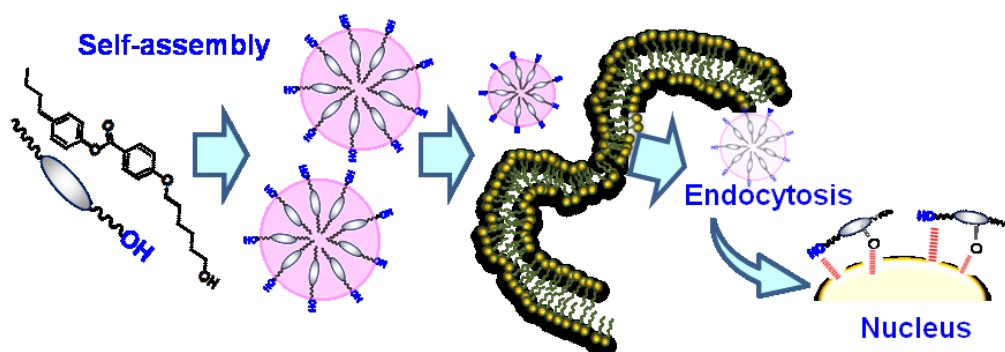


図 24 の A549 細胞の増殖抑制作用メカニズム発現機構の概略

本研究では、血小板産生機構、血球系癌細胞、そして肺癌などの固形癌細胞に及ぼす液晶性化合物の薬理活性作用を検討した。血小板産生における造血システムに対して棒状液晶性化合物が既存の薬剤とは異なる作用を及ぼすこと、また、癌細胞の増殖に対して、DNA 断片化を伴う細胞死を誘導できることを示した。単純な棒状液晶性分子の薬剤としての可能性を広げ、複雑化する薬剤開発に対して、液晶性に基づく新たな分子設計指針を提案した。

Publications

1. The promoting activity on human megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by liquid crystal-related compounds, R. Terasawa, Y. Fukushi, S. Monzen, T. Miura, K. Takahashi, A. Yoshizawa, and I. Kashiwakura, *Biol.Pharm. Bull.*, **32**(6), 976-981 (2009).
2. Liquid crystal-related compound induced cell growth suppression and apoptosis in the chronic myelogenous leukemia K562 cell line, Y. Fukushi, M. Hazawa, K. Takahashi, A. Yoshizawa, I. Kashiwakura, *Invest. new drugs*, **29**, 827-832 (2011).
3. 創薬化学における液晶, 福土由佳子, 吉澤 篤, *EKISHO*, **16**(1), 21-29 (2011)
4. Synthesis and anticancer properties of phenyl benzoate derivatives possessing a terminal hydroxy group, Y. Fukushi, H. Yoshino, M. Sagisaka, I. Kashiwakura and A. Yoshizawa, *J.Mater. Chem. B*, DOI:10.1039/C3TB21736A, in press.

以下の論文は本論文には含まれていない。

1. Suppressive effects of liquid crystal compounds on the growth of U937 human leukemic monocyte lymphoma cells, J. Ishikawa, Y. Takahashi, M. Hazawa, Y. Fukushi, A. Yoshizawa, and I. Kashiwakura, *Cancer Cell International*, **12**(3), (2012).
2. A Liquid crystal-related compound induced cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in the A549 human non-small cell lung cancer cell line, T. wakasaya, H. Yoshino, Y. Fukushi, A. Yoshizawa, I. Kashiwakura, *Int. J. Oncol.*, **42**, 1205-1211 (2013).

謝辞

本研究の薬理活性評価は、弘前大学大学院保健学研究科保健学専攻 柏倉研究室にて柏倉幾郎教授の指導のもと行いました。

本研究を行うにあたり、終始懇切丁寧なご指導ご鞭撻をいただいた弘前大学工学部物質創成化学科の吉澤篤教授に深く感謝致します。

薬理活性評価並びに、実験に関してご指導、ご助言頂きました、柏倉研究室の門前 暁 助教、羽沢 勝治 博士、吉野 浩教 助教、石川 純也氏に感謝いたします。

実験の細部にわたり、ご指導ご助言頂きました高橋 賢治 先生に感謝いたします。

ご助言をいただきました鷺坂将伸助教に深く感謝いたします。

IR 測定をしていただいた山田一人氏に感謝致します。

元素分析測定をしていただいた氏家夏樹氏に感謝致します。

一緒に研究を行ってきた本研究室に在籍している全ての学生の皆様に感謝致します。